

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DER BINDUNG VON PHARMAKA AN PLASMA UND
GEWEBE I N V I T R O UND IHRER VERTEILUNG I N V I V O

Gabriele Schuhmann

Diss
München
1905



Digitized by the Internet Archive
in 2026

BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DER BINDUNG VON PHARMAKA AN PLASMA UND
GEWEBE I N V I T R O UND IHRER VERTEILUNG I N V I V O

Dissertation
der Fakultät Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Gabriele Schuhmann
aus Würzburg

München 1985

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Kurz
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Thoma
- Tag der mündlichen Prüfung : 12. Juli 1985

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, Direktor Prof. Dr. W. Forth, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Kurz durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. Kurz danke ich für die Anregung zu diesem Thema, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, für die Durchsicht meiner Arbeit sowie für die Anregungen zu einer didaktisch guten Darstellungsweise.

Herrn Prof. Dr. K. Thoma danke ich für seine Unterstützung und für sein Interesse, wodurch es mir ermöglicht wurde, diese Arbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie durchzuführen.

Herrn Dr. med. habil. B. Fichtl danke ich besonders für sein Interesse an der Problemstellung der Arbeit, für seine kritischen Anmerkungen, für seine hilfreiche Unterstützung sowie für die Mitbenutzung seiner Rechnerprogramme.

Herrn Dr. E. Richter danke ich für die Einführung in die Methodik der HPLC.

Herrn Dr. E. Haen danke ich für die Mitbenutzung der HPLC und des Textverarbeitungssystems.

I n h a l t s ü b e r s i c h t

	Seite
A. <u>E i n l e i t u n g</u>	5
B. <u>E r g e b n i s s e d e r U n t e r s u c h u n g e n</u> <u>u n d D i s k u s s i o n</u>	10
1. Aspekte zur Untersuchung der Verteilung von Pharmaka	
1. Chemisch-physikalische Eigenschaften der Pharmaka	10
2. Pharmakokinetische Parameter der Pharmaka bei Kaninchen	12
3. Wahl der optimalen Versuchsbedingungen	15
II. Untersuchungen zur Vorhersage der Verteilung von Pharmaka i n v i v o anhand ihrer Bindung i n v i t r o	
1. Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma der i n v i v o gemessenen Verteilung	17
1.a. Vergleich der Verteilung zwischen Plasma und Gewebe nach i.v. Bolus-Injektion und nach Dauerinfusion	25
2. Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma, berechnet aus den i n v i t r o Bindungsdaten	28
3. Beziehungen zwischen der i n v i v o gemessenen und der aus i n v i t r o Bindungsdaten berechneten Verteilung zwischen Plasma und Gewebe	33
3.a. Ergebnisse	33
3.b. Diskussion	41
3.c. Schlußfolgerungen	47

III. Beziehungen zwischen der Plasma- und Gewebefindung von Pharmaka	
1. Beziehungen zwischen der Plasmabindung und der Bindung an Muskelgewebe	49
2. Beziehungen zwischen der Bindung an Leber, Lunge und Niere	53
3. Besonderheiten bei der Plasma- und Gewebefindung von Chinidin in vivo	58
IV. Spezielle Untersuchungen zur Bindung der Pharmaka im Muskelgewebe	
1. Einfluß der Muskelarten	61
2. Einfluß der Lipophilie der Pharmaka	64
3. Quantitative Bedeutung der Bindung an Muskelgewebe	69
4. Pharmakokinetische Bedeutung der Bindung an Muskelgewebe	71
V. Untersuchungen zur möglichen Bedeutung des Fettgewebes für die Verteilung der Pharmaka im Organismus	76
C. <u>E x p e r i m e n t e l l e r T e i l</u>	80
I. Tierexperimentelle Methode	
1. Verabreichung der Pharmaka	80
2. Bestimmung der Plasmakonzentration	81
3. Bestimmung der Gewebekonzentration	82
II. Verteilung der Pharmaka i n v i v o	
1. Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter	83
2. Verteilung nach i.v. Bolus-Injektion und nach Dauerinfusion	85

III. Verteilung der Pharmaka i n v i t r o	
1. Bindung der Pharmaka an Plasma: Dialyse	86
2. Bindung der Pharmaka an Gewebe: Ultrafiltration	91
3. Bestimmung der Verteilungskoeffizienten Lipid/Wasser	94
IV. Rechnerischer Vergleich der i n v i v o und i n v i t r o ermittelten Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma	95
V. Quantitative Bestimmung der untersuchten Pharmaka	
1. Bestimmung der Arzneistoffkonzentration im Plasma und in wässriger Lösung	97
2. Bestimmung der Arzneistoffkonzentration im Gewebe	103
3. Meßverfahren	108
3.a. Hochdruckflüssigkeitschromatographie	108
3.b. Radiometrische Messung	114
3.c. Photometrische Messung	115
VI. Rechnerische Auswertung der Meßdaten	117
D. <u>T a b e l l e n a n h a n g</u>	118
E. <u>Z u s a m m e n f a s s u n g</u>	125
F. <u>L i t e r a t u r</u>	129

A b k u r z u n g e n

C	: Gesamtkonzentration eines Pharmakons
C _G	: Gesamtkonzentration eines Pharmakons im Gewebe
C _{Gf}	: freie Konzentration eines Pharmakons im Gewebe
C _P	: Gesamtkonzentration eines Pharmakons im Plasma
C _{Pf}	: freie Konzentration eines Pharmakons im Plasma
Cl	: Clearance
cpm	: Impulse pro Minute (counts per minute)
D	: Gesamtmenge eines Pharmakons
dpm	: Zerfall pro Minute (decays per minute)
f _G	: freier Anteil des Pharmakons im Gewebehomogenat
f _P	: freier Anteil des Pharmakons im Plasma
k _α	: Geschwindigkeitskonstante der α-Phase (Verteilungsphase) eines Pharmakons
k _β	: Geschwindigkeitskonstante der β-Phase (Eliminationsphase) eines Pharmakons
p	: Irrtumswahrscheinlichkeit
pK _a	: Dissoziationskonstante eines Pharmakons
r	: Korrelationskoeffizient
r _S	: Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
S.E.	: Standardfehler des arithmetischen Mittels (standard error)
t _{1/2}	: Halbwertszeit
V	: Verteilungsvolumen
V _f	: Verteilungsvolumen der ungebundenen Substanz
V _{rel}	: relativer Variationskoeffizient
VK-Gewebe/Plasma	: in vivo Verteilungskoeffizient Gewebe/Plasma
VK-Lipid/Wasser	: in vitro Verteilungskoeffizient Lipid/Wasser

A. E i n l e i t u n g

Soll ein Pharmakon die zur Erzielung eines bestimmten Effektes notwendige Konzentration am Wirkort erreichen, ist es für die Dosierung wichtig, das pharmakokinetische Verhalten des Arzneistoffs im Organismus im voraus zu kennen.

In den letzten Jahren wurden verschiedene mathematische Modelle entwickelt, die die Verteilung und Elimination eines Pharmakons im Organismus simulieren:

das "klassische" pharmakokinetische Modell beschreibt mit Hilfe von Ein- oder Zweikompartiment-Modellen den zeitabhängigen Konzentrationsverlauf des Pharmakons im Blut oder Urin. Dabei werden im "zentralen Kompartiment" verschiedene Körpergewebe vereinfacht als ein großes Kompartiment betrachtet. Durch die Verwendung solcher fiktiver Kompartimente, die den wirklichen Verhältnissen nicht entsprechen, ist es jedoch nicht möglich, die Arzneistoffkonzentration am Wirkort (Zielorgan, Gewebe) vorherzusagen (30).

Basierend auf physiologischer Grundlage wurden deshalb Modelle entwickelt, in welchen die einzelnen Kompartimente ein spezielles Organ oder Körpergewebe darstellen. In einem solchen physiologisch-pharmakokinetischen Modell ist es möglich, mit Hilfe von Information über physiologische und physikochemische Parameter (Organvolumen, Perfusionsrate, Metabolisierung, Bindungskonstante der Pharmaka an Plasma und Gewebe) für jedes Kompartiment den Konzentrationsverlauf des Pharmakons durch eine mathematische Gleichung zu beschreiben (96). Abb. 1 soll diesen Sachverhalt veranschaulichen. Durch Entwicklung eines solchen mathematischen Modells, basierend auf physiologischen Parametern, ist es Bischoff et al. (1) erstmals gelungen, die Verteilung von Tniopental im Organismus des Hundes vorherzusagen. Weiterhin konnte für Salicylsäure (2), Lidocain (3), Methotrexat (4) und Digoxin (5) die berechnete Organverteilung mit der in vivo gemessenen in gute Übereinstimmung gebracht werden.

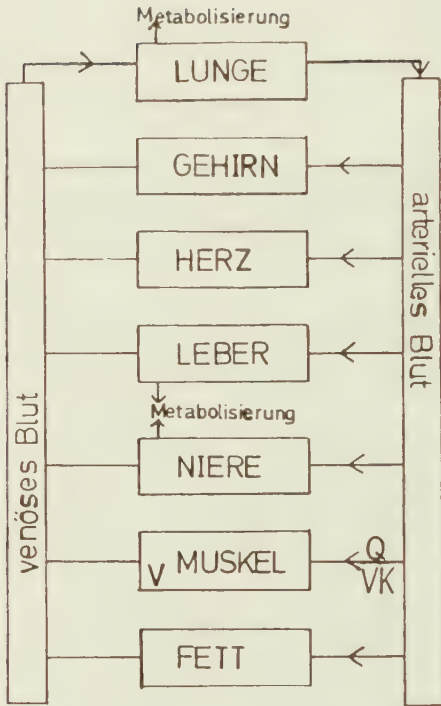


Abb. 1: Schematische Darstellung eines physiologisch-pharmakokinetischen Modells (modifiziert nach (9))

Die wichtigsten Metabolisierungs-orte sind gekennzeichnet. Das Organvolumen V , die Perfusionsrate Q und der Verteilungskoeffizient Gewebe/Plasma VK sind die wichtigsten Parameter zur Ermittlung der Pharmakonzentration zur Zeit t in einem bestimmten Kompartiment.

Für physiologisch-pharmakokinetische Modelle ist es wichtig, die Verteilung der Pharmaka zwischen Plasma und Gewebe zu kennen. Der Parameter, der diese Verteilung beschreibt, ist der Verteilungskoeffizient Gewebe/Plasma. Der Verteilungskoeffizient Gewebe/Plasma ist definiert als der Quotient aus der Gesamtkonzentration des Pharmakons im Gewebe und der Gesamtkonzentration des Pharmakons im Blut bzw. Plasma (97).

Eine Möglichkeit zur Kenntnis des Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma besteht darin, die Konzentration im Plasma und im Gewebe nach i.v. Gabe des Pharmakons zu messen. Diese Methode ist aber aufwendig und kostspielig; außerdem wird das Ziel, die Verteilung eines Pharmakons im Organismus vorherzusagen, nicht erreicht.

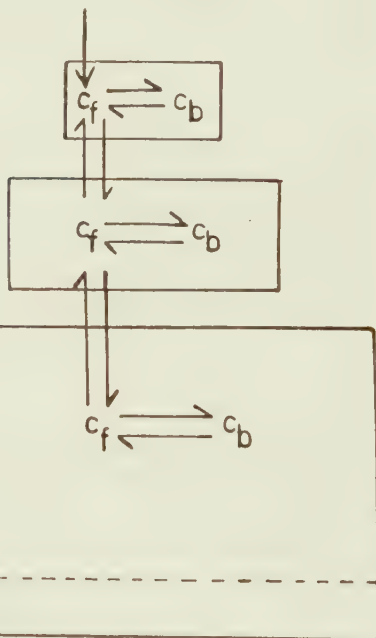
Einfacher wäre es, wenn es gelänge, durch in vitro Bindungsstudien der Pharmaka an Plasma und Gewebe Bindungswerte zu messen, die für die Verhältnisse in vivo relevant sind, und die so in vitro ermittelte Verteilung der Pharmaka zwischen Plasma und Gewebe in ein physiologisch-pharmakokinetisches Modell einzubeziehen. Bei der Bestimmung der in vitro Bindungsdaten der Pharmaka an Plasma und Gewebe wird jeweils die freie Arzneistoffkonzentration gemessen; unter der Annahme, daß in vivo im Gleichgewicht die freie Konzentration des Pharmakons im Plasma und Gewebe gleich groß ist, können dann aus den Bindungsdaten der Pharmaka die in vivo Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma berechnet werden.

Prinzipiell kann die Gewebefindung in vitro einfach durch die Bindung der Pharmaka an Gewebekomogenate ermittelt werden. Die Frage ist, ob die in vitro mit Gewebekomogenaten erhaltenen Bindungsdaten auf die Situation in vivo extrapoliert werden können. Frühere Untersuchungen unseres Arbeitskreises zeigen, daß die Bindungseigenschaften von Muskelgewebe durch Homogenisieren nicht entscheidend verändert werden (8), so daß es möglich scheint, die Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma unter Umgehung von in vivo Experimenten vorherzusagen. Auch Lin et al. (6) ist es gelungen, für den Arzneistoff Ethoxybenzamid einen durch in vitro Bindungsstudien ermittelten Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma in ein physiologisch-pharmakokinetisches Modell erfolgreich einzubeziehen; darüber hinaus war es möglich, das für die Ratte entworfene Modell auf das Kaninchen zu übertragen ("animal scale up"). Dagegen waren Igari et al. (7) gescheitert, mit in vitro gewonnenen Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma die Verteilung von Hexobarbital, Phenobarbital und Thiopental im Organismus vorherzusagen.

Es ist deshalb wichtig, durch weitere Untersuchungen die Frage zu klären, ob es möglich ist, in vitro gewonnene Bindungsdaten von Pharmaka an Gewebekomogenate auf die Situation in vivo zu extrapolieren.

Auch aus anderen Gründen ist es wichtig, die Gewebebindung der Pharmaka zu kennen. Wird ein Pharmakon dem Organismus i.v. verabreicht, so stellt sich zunächst im Plasma ein Gleichgewicht zwischen gebundener und freier Konzentration ein. Nur die freien, im Plasma nicht gebundenen Arzneistoffmoleküle können in die Gewebe diffundieren und dort gebunden werden. Im Gewebe stellt sich dann -ebenso wie im Plasma- ein Gleichgewicht zwischen gebundener und freier Pharmakonkonzentration ein (vgl. Abb. 2), und

Zufuhr des Pharmakons



PLASMA-RAUM

3 l Wasser

ca. 180 g Proteine

INTERSTITIELLER-RAUM

9 l Wasser

ca. 180 g Albumin

GEWEBE-RAUM

30 l intrazelluläres
Wasser

10 kg makromolekulare Ge-
webestrukturen (Proteine,
Nukleinsäuren, ...)

15 kg Fettgewebe

Abb. 2: Darstellung der Verteilungsvorgänge (vereinfacht) eines Pharmakons im dynamischen Gleichgewichtszustand (modifiziert nach (15))

Die Mengenangaben beziehen sich auf einen Menschen mit 70 kg Körpergewicht

c_f = freie Pharmakonkonzentration

c_b = gebundene Pharmakonkonzentration

nur die im Gewebe freien, ungebundenen Arzneistoffmoleküle können zum Wirkort gelangen, so daß gilt: wirksame Konzentration = freie Konzentration im Gewebe. Diese freie Konzentration kann durch in vitro Bindungsstudien der Pharmaka an Gewebekomponenten ermittelt werden. Aus dieser Überlegung wird deutlich, daß die Kenntnis der Gewebefixierung für die Ermittlung der wirksamen Konzentration eines Pharmakons von großer Bedeutung ist.

Auch für das Verteilungsvolumen der Arzneistoffe ist die Gewebefixierung von großer Wichtigkeit. Abb. 2 zeigt vereinfacht die Größenverhältnisse derjenigen Räume, in die sich ein Pharmakon nach i.v. Gabe verteilt. Das große Volumen des Gewebraumes und die darin befindliche große Menge an makromolekularen Gewebestrukturen, die für die Gewebefixierung eines Pharmakons verantwortlich sind, sind der Grund, warum die größte Menge eines verabreichten Pharmakons nach seiner Verteilung im Organismus in den Geweben zu finden ist.

Aus diesen Überlegungen entwickelt sich die Frage: Können die in vitro mit Gewebekomponenten erhaltenen Bindungsdaten der Pharmaka auf die Situation in vivo extrapoliert werden? Kann man anhand von Ergebnissen aus in vitro Bindungsstudien die Verteilung von Arzneistoffen in vivo vorhersagen?

Unter dieser Fragestellung wurden 11 Modellsubstanzen am Kaninchen untersucht. Die untersuchten Pharmaka repräsentieren ein breites Spektrum physikochemischer Eigenschaften (Ionisationsgrad, Säure-Base-Charakter, Lipidlöslichkeit), die für die Verteilung von Pharmaka im Organismus von Bedeutung sind. Bei der Auswahl der Pharmaka wurde weiterhin darauf geachtet, daß Substanzen mit unterschiedlich hohen Verteilungsvolumina untersucht wurden.

B. E r g e b n i s s e d e r U n t e r s u c h u n g e n u n d D i s k u s s i o n

1. Aspekte zur Untersuchung der Verteilung von Pharmaka

1.1. Chemisch-physikalische Eigenschaften der Pharmaka

Es ist bekannt, daß die Plasma- und Gewebefindung eines Pharmakons in vitro bzw. seine Verteilung im Organismus unter anderem von den physikalisch-chemischen Eigenschaften des Pharmakons geprägt wird (73, 93). Für die Bindung an Plasma und Gewebe ist es wichtig, den pK_a -Wert (Ionisationsgrad) und den Verteilungskoeffizienten Lipid/Wasser (Lipidlöslichkeit) zu kennen (68). Tab. 1 enthält eine Zusammenstellung der untersuchten Pharmaka: sowohl Säuren als auch Basen wurden untersucht; dabei lag der Ionisationsgrad bei physiologischem pH-Wert zwischen nahe 0 % (Diazepam) und über 99 % (Propranolol); bezüglich ihres Oktanol-Puffer-Verteilungskoeffizienten unterschieden sich die einzelnen Pharmaka bis zu 5 logarithmischen Einheiten.

Die Ionisationskonstanten (pK_a -Werte) wurden der Literatur entnommen. Die Literaturangaben über die Verteilungskoeffizienten Lipid/Wasser differierten teilweise beträchtlich. Soweit Untersuchungen zur Messung der Verteilungskoeffizienten vorliegen (98, 99), haben diese gezeigt, daß sich in einem Zweiphasensystem aus Oktanol und Puffer die besten Korrelationen zur Proteinbindung ergeben (67, 102). Außerdem wurde festgestellt (98), daß die Verteilung zwischen Lipid- und Wasserphase bei geladenen Substanzen auch von der Zusammensetzung des Puffers abhängt; dabei zeigte sich, daß Phosphatpuffer für die Messung der Verteilungskoeffizienten Lipid/Wasser am besten geeignet ist. Da die in der Literatur angegebenen Verteilungskoeffizienten bei unterschiedlichen Puffersystemen ermittelt wurden, sind unterschiedliche Ergebnisse nicht verwunderlich.

Wir haben deshalb die Verteilungskoeffizienten Lipid/Wasser in einem System aus Oktanol und Phosphatpuffer pH 7,0 bestimmt, derselbe Puffer, mit dem auch die in vitro Bindungsstudien durchgeführt wurden.

ARZNEISTOFF	SÄURE:S BASE :B	pK _a -WERT	VERTEILUNGSKOEFFIZIENT (OKTANOL-PUFFER pH=7)	%-ion. bei pH=7
BARBITAL	S	7,8	4,5	13,7
BUPHENIN	B	8,9*	4,0	98,8
CHINIDIN	B	8,6	48	97,5
DIAZEPAM	B	3,3	720	0,02
IMIPRAMIN	B	9,4	146	99,6
PENTOBARBITAL	S	8,0	124	9,1
PHENOBARBITAL	S	7,3	21	33,4
PHENYLBUTAZON	S	4,5	6,1	99,7
PROPRANOLOL	B	9,5	5,4	99,7
SALICYLSÄURE	S	3,0	0,02	100,0
THIOPENTAL	S	7,4	846	28,5

Tab. 1: pK_a-Werte, Verteilungskoeffizienten Oktanol/Puffer und Ionisationsgrad der untersuchten Pharmaka

Die pK_a-Werte sind der Literatur entnommen (Herzfeldt (10)).

Die Verteilungskoeffizienten zwischen Oktanol und Puffer wurden bei pH 7,0 bestimmt. Es handelt sich um Mittelwerte aus 3 - 5 Versuchen, V_{rel} zwischen 5 und 15 %.

*: Angabe des Herstellers

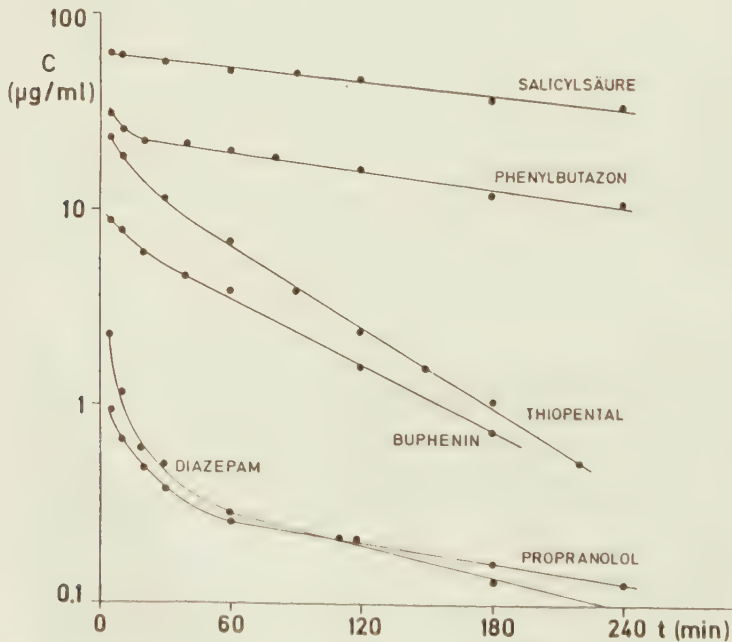
Der Ionisationsgrad (in %) bei pH 7,0 wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Säuren: \%ionisiert} = \frac{1}{1 + 10^{\text{pK}_a - \text{pH}}} \cdot 100$$

$$\text{Basen: \%ionisiert} = \frac{1}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_a}} \cdot 100$$

1.2. Pharmakokinetische Parameter der Pharmaka bei Kaninchen

Um bei den Verteilungsstudien *in vivo* die Pharmaka richtig zu dosieren, war es notwendig, die pharmakokinetischen Parameter der Arzneistoffe zu kennen. Außerdem ist durch die Kenntnis des Verteilungsvolumens (V) eines Pharmakons schon eine Aussage über das Ausmaß seiner Bindung an Gewebe möglich. Daher wurden die pharmakokinetischen Parameter von Buphenin, Diazepam, Phenylbutazon, Propranolol, Salicylsäure und Thiopental wie unter C.II.1. beschrieben nach i.v. Bolus-Injektion des Arzneistoffs bestimmt. Dabei ergab sich für den zeitlichen Konzentrationsverlauf der Pharmaka im Plasma folgendes Bild:



Tab. 3: Zeitlicher Verlauf der Plasmakonzentration von Arzneistoffen nach i.v. Bolus-Injektion

Beispiele von Einzelversuchen

(zur Methode vgl. C.II.1.)

Bei Salicylsäure folgt der Kurvenverlauf einer Einkompartiment-kinetik, bei allen anderen Arzneistoffen einer Zweikompartiment-kinetik. Aus dem Kurvenverlauf wurden die pharmakokinetischen Parameter V , Cl , $t_{1/2}(\alpha)$, $t_{1/2}(\beta)$ berechnet (C.II.1.). Sie sind in Tab. 2 aufgeführt. Die pharmakokinetischen Parameter weiterer Pharmaka (Barbital, Chinidin, Diazepam, Pentobarbital, Phenobarbital) wurden der Literatur entnommen und ebenfalls in Tab. 2 dargestellt.

Aus der Tabelle geht hervor, daß die pharmakokinetischen Parameter der untersuchten Arzneistoffe ein breites Spektrum umfaßten: die Verteilungsvolumina (V) reichten von 0,16 l/kg (Salicylsäure) bis zu 14,4 l/kg (Propranolol), die Eliminationshalbwertszeiten $t_{1/2}(\beta)$ lagen zwischen 43 min (Pentobarbital) und 27,3 h (Phenobarbital).

ARZNEISTOFF	$t_{1/2}(\alpha)$ (min)	$t_{1/2}(\beta)$ (min)	V (l/kg)	Cl (ml/kg/min)	Quelle
BARBITAL	*	1003	0,48	0,33	(11)
BUPHENIN	3,5	51	1,8	24,5	e.U.
CHINIDIN	5,8	67	4,2	43,4	(12)
DIAZEPAM	18,0	162	5,5	23,5	(13)
IMIPRAMIN	4,5	95	12,8	93,3	e.U.
PENTOBARBITAL	*	43	0,81	13,0	(11)
PHENOBARBITAL	*	1642	0,51	0,21	(11)
PHENYLBUTAZON	3,0	166	0,19	0,79	e.U.
PROPRANOLOL	6,1	121	14,4	82,4	e.U.
SALICYLSAURE	*	245	0,16	0,45	e.U.
THIOPENTAL	9,4	48	1,1	15,8	e.U.

Tab. 2: Pharmakokinetische Parameter von Arzneistoffen bei Kaninchen nach i.v. Bolus Injektion

$t_{1/2}(\alpha)$: Halbwertszeit der α -(Verteilungs)-Phase

$t_{1/2}(\beta)$: Halbwertszeit der β -(Eliminations)-Phase

V : Verteilungsvolumen

Cl : Clearance

* : Plasmakonzentrationsverlauf folgt einer Einkompartimentkinetik (α -Phase nicht meßbar)

e.U. : eigene Untersuchungen;

für die der Literatur entnommenen Daten ist die Nummer des betreffenden Zitates angegeben

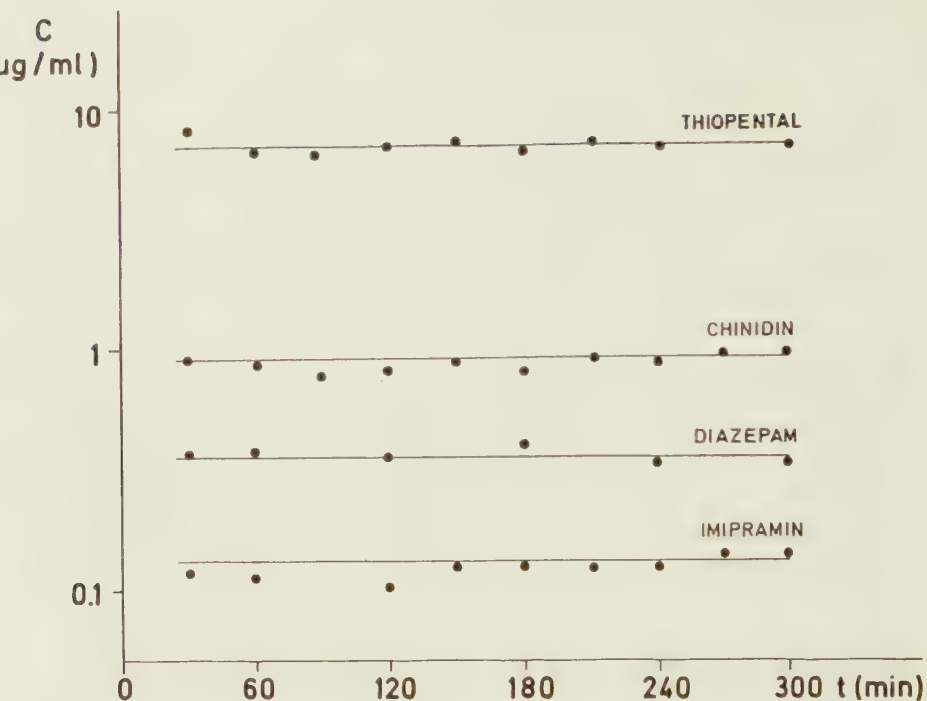
I.3. Wahl der optimalen Versuchsbedingungen

Will man die Bindung eines Pharmakons an Gewebe in vivo bestimmen, muß man warten, bis sich das Pharmakon nach seiner Verabreichung in alle Körpergewebe verteilt hat. Erst wenn sich ein Gleichgewicht zwischen der Arzneistoffkonzentration im Blut und in den Geweben eingestellt hat, ist es sinnvoll, die Konzentration des Pharmakons im Gewebe zu messen und damit den Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma zu bestimmen.

Zu diesem Zweck wurden zwei Arten von Versuchen durchgeführt: Im ersten Fall wurden die Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma nach Dauerinfusion des Pharmakons bestimmt. Abb. 4 zeigt, daß für Chinidin, Diazepam, Imipramin und Thiopental eine konstante Plasmakonzentration über 5 h aufrechterhalten wurde. Daraus geht hervor, daß bei Beendigung der Dauerinfusion ein Gleichgewichtszustand erreicht war, und daß die Plasma- und Gewebekonzentration des Pharmakons in diesem Gleichgewicht (steady-state) gemessen wurden.

Beim zweiten Versuchstyp wurden die VK Gewebe/Plasma 3 h nach i.v. Bolus-Injektion des Pharmakons bestimmt. Betrachtet man die pharmakokinetischen Daten in Tab. 2, erkennt man, daß die α -Phase (Verteilungsphase) aller Pharmaka -mit Ausnahme von Diazepam- sehr klein war. Geht man davon aus, daß die Verteilungsphase nach $4 - 5 t_{1/2}(\alpha)$ abgeschlossen ist, stellt man fest, daß nach spätestens 1 h für alle Pharmaka (Diazepam ausgenommen) die Verteilungsphase abgeschlossen war. Folglich kann man davon ausgehen, daß 3 h nach i.v. Bolus-Injektion ein Gleichgewicht bestand zwischen der Pharmakonkonzentration im Blut und in den Geweben, und daß die VK Gewebe/Plasma in diesem Verteilungsgleichgewicht bestimmt wurden.

Um festzustellen, ob die zwei Versuchstypen eventuell zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der VK Gewebe/Plasma führen, wurden bei Chinidin, Imipramin und Thiopental die Konzentrationen in Plasma und Gewebe sowohl nach i.v. Bolus-Injektion als auch nach Dauerinfusion bestimmt.



Tab. 4: Zeitlicher Konzentrationsverlauf der Arzneistoffe im Plasma nach i.v. Gabe einer Initialdosis und anschließender Dauerinfusion des Arzneistoffs

Beispiele von Einzelversuchen

(zur Methode vgl. C.II.2.)

II. Untersuchungen zur Vorhersage der Verteilung von Pharmaka i n v i v o anhand ihrer Bindung i n v i t r o

II.1. Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma der i n v i v o gemessenen Verteilung

In Tab. 3 (S. 20) ist die jeweilige Gesamtkonzentration der Arzneistoffe in Plasma und Gewebe 3 h nach i.v. Bolus-Injektion dargestellt; auch die Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma (Quotient aus der Gesamtkonzentration des Pharmakons in Gewebe und Plasma = $\text{Ges.Konz.Gewebe} / \text{Ges.Konz.Plasma}$) sind in Tab. 3 aufgeführt; ferner wurde als Maß für die Gewebefixierung der Quotient aus der Gesamtkonzentration des Pharmakons im Gewebe und der freien Konzentration im Plasmawasser (= $\text{Ges.Konz.Gewebe} / \text{freie Konz.Plasma}$) angegeben.

Das eigentliche Maß für die Gewebefixierung wäre der Quotient aus der Gesamtkonzentration des Pharmakons im Gewebe und der freien Konzentration im Gewebewasser. Die freie Konzentration im Gewebewasser ist aber nicht direkt meßbar. Deshalb sind wir von folgender Überlegung ausgegangen: von der im Blut befindlichen Arzneistoffmenge können nur die freien, nicht an Plasmaproteine gebundenen Arzneistoffmoleküle in die Gewebe diffundieren und dort gebunden werden; ist die Verteilung des Arzneistoffs zwischen Plasma und Gewebe abgeschlossen, stellt sich ein Gleichgewicht zwischen der Konzentration im Blut bzw. Plasma und den Geweben ein; in diesem Gleichgewicht gilt: freie Konzentration des Pharmakons im Gewebewasser = freie Konzentration des Pharmakons im Plasmawasser. Die freie Arzneistoffkonzentration im Plasmawasser ist -im Gegensatz zur freien Konzentration im Gewebewasser- meßbar, und wurde deshalb herangezogen, um die Gewebefixierung in vivo zu bestimmen.

Bei den Verteilungsstudien nach i.v. Bolus-Injektion wurde der freie Pharmakonanteil im Plasma der Versuchstiere nicht bestimmt. Um die Gewebefixierung trotzdem ermitteln zu können, wurden die Plasmabindungsdaten aus den in vitro Experimenten (Tab. 6, S. 32) herangezogen, um die freie Arzneistoffkonzentration im Plasmawas-

ser zu ermitteln. Die Verwendung der in vitro Bindungsdaten der Pharmaka an Plasma war möglich, da die Bindung im linearen Bereich und somit konzentrationsunabhängig gemessen wurde (vgl. B. II.2.). Außerdem kann gezeigt werden, daß der freie Pharmakonanteil, ermittelt durch in vitro Bindungsstudien, nur wenig differiert vom freien Pharmakonanteil, der im Plasma der Versuchstiere gemessen wurde: der Quotient (C_p/C_{pf}) war bei Chindin in vitro 6,7 gegenüber 11,2 in vivo, bei Imipramin 4,1 gegenüber 5,6 und bei Thiopental 6,7 gegenüber 7,1; bei Diazepam war er in vitro und in vivo 11,1. Die etwas größeren Abweichungen bei Chinidin sind vermutlich auf die großen interindividuellen Unterschiede in der Plasmabindung von Chinidin bei Kaninchen zurückzuführen (12).

Die Ergebnisse in Tab. 3. sind Mittelwerte aus 3 - 5 Versuchen und streuten mit einem relativen Variationskoeffizienten von 5 - 15 %. Die starken Streuungen der Gesamtkonzentrationen von Propranolol in der Leber und von Thiopental in der Niere sind vermutlich auf Besonderheiten in der Gewebeverteilung zurückzuführen (vgl. B. II.3.b.); denn wären die starken Streuungen durch die Analysenmethode bedingt, mußten auch die Gesamtkonzentrationen in den anderen untersuchten Organen stärker streuen, was nicht der Fall ist.

Die Untersuchungsergebnisse der Verteilung von Pharmaka nach Dauerinfusion sind in Tab. 4 (S. 23) zusammengefaßt. Die Gesamtkonzentrationen der Pharmaka streuten mit einem relativen Variationskoeffizienten zwischen 5 und 15 %. Lediglich bei Diazepam (Lunge) und bei Imipramin (Leber) lag dieser höher. Auch hier ist anzunehmen, daß dies auf Besonderheiten in der Gewebeverteilung zurückzuführen ist (vgl. B. II.3.b.).

Vergleicht man die gemessenen Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma sämtlicher untersuchter Pharmaka, fällt auf, daß es unter den einzelnen Stoffen große Unterschiede bezüglich der Größe der VK-Gewebe/Plasma gibt. Verglichen mit der jeweiligen Plasmakonzentration der Arzneistoffe lassen sich 3 Gruppen unterscheiden:

- Pharmaka, bei denen die Gewebekonzentration sehr viel höher ist (bis über 100 mal) als die Plasmakonzentration, z.B. Chinidin, Imipramin, Propranolol (VK-Gewebe/Plasma bis über 100);
- Pharmaka, deren Gewebekonzentration etwa der Plasmakonzentration entspricht, z.B. Barbiturate (VK-Gewebe/Plasma um 1);
- Pharmaka, deren Konzentration im Gewebe kleiner ist als im Plasma, z.B. Phenylbutazon, Salicylsäure (VK-Gewebe/Plasma kleiner als 0,5).

Die verschieden hohen VK-Gewebe/Plasma befinden sich in Analogie zu den Verteilungsvolumina der Pharmaka im Organismus:

- Pharmaka mit hohen Gewebekonzentrationen und damit großen VK-Gewebe/Plasma haben große Verteilungsvolumina (z.B. haben Chinidin, Imipramin und Propranolol ein Verteilungsvolumen von $> 4 \text{ l/kg}$);
- Pharmaka mit niedrigen Gewebekonzentrationen und kleinen VK-Gewebe/Plasma haben kleine Verteilungsvolumina (z.B. haben Phenylbutazon und Salicylsäure ein Verteilungsvolumen von $< 0,2 \text{ l/kg}$).

Für Diazepam mit einem hohen Verteilungsvolumen ($V = 5,5 \text{ l/kg}$) würde man analog hohe Konzentrationen im Gewebe erwarten. Gemessen wurden aber Gewebekonzentrationen, die nur wenig über denen im Plasma lagen, so daß die VK-Gewebe/Plasma Werte zwischen 0,9 und 2,8 annahmen. Dabei ist zu bedenken, daß sich Diazepam als gut lipidlösliche Substanz im Fettgewebe anreichern kann. Igari et al. (9) haben an Ratten Diazepam i.v. verabreicht und fanden 6 Stunden nach Injektion in den Organen VK-Gewebe/Plasma zwischen 1,02 (Gehirn) und 4,89 (Leber) -passend zu unseren Ergebnissen-, im Fettgewebe allerdings solche von 12,9. Das würde die Vermutung bestätigen, daß das hohe Verteilungsvolumen von Diazepam im Organismus nicht nur durch die Bindung an Gewebe, sondern hauptsächlich auf die gute Verteilung im Fettgewebe zurückzuführen ist.

	Plasma	Leber	Lunge	Niere	Muskel
<u>BARBITAL</u>	C	35.5 ± 0.5 (1.0)	40.5 ± 1.1 (1.9)	31.2 ± 1.5 (1.3)	33.0 ± 1.5 (1.8) 25.6 ± 1.3 (3.2)
	(C _G /C _P)	1.14	0.88	0.93	0.72
	(C _G /C _{Pf})	1.37	1.2	1.3	0.99
<u>BUPHENIN</u>	C	0.84 ± 0.2 (11.9)	8.9 ± 1.7 (9.6)	12.0 ± 2.6 (8.3)	8.7 ± 1.8 (10.3) 2.3 ± 0.7 (15.2)
	(C _G /C _P)	10.6	14.3	10.4	2.7
	(C _G /C _{Pf})	2.3	24.4	23.8	6.3
<u>CHINIDIN</u>	C	0.4 ± 0.03 (5.3)	3.4 ± 0.34 (7.0)	9.2 ± 0.76 (5.8)	6.2 ± 0.37 (4.2) 0.57 ± 0.04 (5.0)
	(C _G /C _P)	8.5	23.0	15.5	1.4
	(C _G /C _{Pf})	6.7	56.8	103	9.5

Tab. 3: in vivo gemessene Verteilung von Pharmaka 3 h nach i.v. Bolus-Injektion

C : Gesamtkonzentration der Pharmaka in Plasma C_P und Gewebe C_G, angegeben in (µg/ml) bzw. (µg/g); Mittelwerte ± S.E. aus 3 - 5 Versuchen; in Klammer: V_{rel} in %.

(C_G/C_P) : Verteilungskoeffizient Gewebe/Plasma = Quotient aus der Gesamtkonzentration des Pharmakons im Gewebe u. im Plasma
(C_G/C_{Pf}) : Gewebebindung = Quotient aus der Gesamtkonzentration des Pharmaka an Plasma (Tab. 6, S. 32) errechnet: C_{Pf} = f_P · C_P.

C_{Pf} wurde aus den in vitro Bindungsdaten der Pharmaka an Plasma (Tab. 6, S. 32) errechnet: C_{Pf} = f_P · C_P.
In der Spalte "Plasma" heisst der Quotient (C_P/C_{Pf}) -analog zur Gewebebindung; dieser Quotient wurde aus Tab. 6 übernommen.

	Plasma	Leber	Lunge	Niere	Muskel
<u>PHENYLBUTAZON C</u>	37.5 + 4.1 (7.7)	9.0 + 1.9 (14.9)	5.6 + 1.0 (12.6)	18.8 + 3.2 (12.0)	3.4 + 0.8 (16.6)
(C _G /C _P)	0.24		0.15	0.5	0.09
(C _G /C _{PF})	40.0	9.6	6.0	20.0	3.6
<u>PHENOBARBITAL C</u>	33.3 + 0.9 (1.6)	41.6 + 1.9 (2.6)	26.3 + 2.1 (4.6)	31.3 + 1.7 (3.1)	24.3 + 1.3 (3.1)
(C _G /C _P)	1.15		0.73	0.89	0.69
(C _G /C _{PF})	2.9	3.6	2.3	2.7	2.1
<u>PENTOBARBITAL C</u>	5.2 + 0.09 (1.0)	14.1 + 0.5 (2.0)	7.8 + 0.95 (7.0)	9.67 + 0.79 (4.7)	5.13 + 0.6 (6.8)
(C _G /C _P)	2.72		1.5	1.86	0.99
(C _G /C _{PF})	2.8	7.6	4.2	5.2	2.8

Fortsetzung von Tab. 3; Legende siehe S. 20

	Plasma	Leber	Lunge	Niere	Muskel	
<u>PROPRANOLOL</u>	C	0.28 $\pm$ 0.04 (10.1)	0.5 $\pm$ 0.22 (31.1)	44.5 $\pm$ 6.5 (10.3)	18.2 $\pm$ 3.3 (12.8)	1.34 $\pm$ 0.11 (5.8)
	(C _G /C _P)	1.8	159	65.0	4.8	
	(C _G /C _{Pf})	2.9	5.17	460	188	13.9
<u>SALICYLSAURE</u>	C	41.0 $\pm$ 3.5 (4.3)	8.6 $\pm$ 0.7 (4.1)	13.9 $\pm$ 1.2 (4.3)	12.3 $\pm$ 1.8 (7.3)	5.74 $\pm$ 0.6 (5.2)
	(C _G /C _P)	0.21	0.34	0.3	0.14	
	(C _G /C _{Pf})	9.1	1.9	3.1	2.7	1.27
<u>THIOPENTAL</u>	C	2.44 $\pm$ 0.21 (5.0)	5.95 $\pm$ 0.76 (7.4)	2.64 $\pm$ 0.08 (1.7)	7.32 $\pm$ 2.47 (19.5)	1.75 $\pm$ 0.2 (6.6)
	(C _G /C _P)	2.4	1.1	3.0	0.72	
	(C _G /C _{Pf})	6.7	16.3	7.2	19.9	4.8

Fortsetzung von Tab. 3; Legende siehe S. 20

	Plasma	Leber	Lunge	Niere	Muskel	
<u>CHINIDIN</u>	C	2.1 + 0.4 (9.4)	26.1 + 7.7 (14.7)	81.2 +22.6 (13.9)	58.7 +19.8 (16.9)	3.9 + 1.4 (17.9)
(C _G /C _P)		12.4	38.7	28.0	1.86	
(C _G /C _{PF})	11.2	136	454	273	17.8	
<u>DIAZEPAM</u>	C	1.0 +0.09 (5.1)	2.79+0.69 (14.3)	0.64± 0.38 (34.3)	2.66+0.38 (8.2)	0.95+0.13 (7.9)
(C _G /C _P)		2.8	0.6	2.6	0.94	
(C _G /C _{PF})	11.1	30.7	7.0	29.3	10.5	
<u>IMIPRAMIN</u>	C	0.48+0.12 (12.5)	1.2 + 0.9 (37.5)	65.8 + 19.3 (14.6)	42.2 +27.1 (32.1)	4.1 + 1.3 (15.8)
(C _G /C _P)		2.4	137	87.9	8.5	
(C _G /C _{PF})	5.6	14.0	767	494	48.8	
<u>THIOPENTAL</u>	C	9.5 + 1.4 (8.5)	21.1 + 4.7 (12.9)	8.1 + 1.6 (11.4)	38.0 +10.4 (15.8)	4.7 + 1.1 (13.3)
(C _G /C _P)		2.2	0.9	4.0	0.49	
(C _G /C _{PF})	7.1	15.6	6.0	28.1	3.5	

Tab. 4: in vivo gemessene Verteilung von Pharmaka nach i.v. Gabe einer Initialdosis und anschließender Dauerinfusion
 Legende siehe S. 24

Legende zu Tab. 4:

in vivo gemessene Verteilung von Pharmaka nach i.v. Gabe einer
Initialdosis und anschließender Dauerinfusion

- C : Gesamtkonzentration der Pharmaka in Plasma C_p und
Gewebe C_G , angegeben in ($\mu\text{g/ml}$) bzw. ($\mu\text{g/g}$); Mittel-
werte $\pm$ S.E. aus 4 - 5 Versuchen.
- (C_G/C_p) : Verteilungskoeffizient Gewebe/Plasma = Quotient aus
der Gesamtkonzentration des Pharmakons im Gewebe und
im Plasma
- (C_G/C_{pf}) : Gewebefreebindung = Quotient aus der Gesamtkonzentration
des Pharmakons im Gewebe und freier Konzentration im
Plasma;
 C_{pf} wurde ermittelt durch Dialyse des Plasmas der Ver-
suchstiere (nach C.III.1.).
In der Spalte "Plasma" heißt der Quotient (C_p/C_{pf}) ,
analog zur Gewebefreebindung.

II.1.a. Vergleich der Verteilung zwischen Plasma und Gewebe nach i.v. Bolus-Injektion und nach Dauerinfusion

Das Ziel war es, festzustellen, ob die Untersuchung der Verteilung der Pharmaka im Organismus nach Dauerinfusion bzw. nach i.v. Bolus-Injektion zu gleichen Ergebnissen führt. Deshalb wurden bei Chinidin, Imipramin und Thiopental die Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma beider Versuchstypen miteinander verglichen. Die VK-Gewebe/Plasma von Imipramin nach i.v. Bolus-Injektion wurden dabei aus den Untersuchungen von Dingell et al. (14) errechnet und sind in Tab. 5 aufgeführt.

Die Ergebnisse beider Versuchstypen stimmen dann gut überein, wenn die in Abb. 5 gezeigten Meßpunkte nahe der hypothetischen Geraden mit der Steigung 1 liegen. Dies ist bei Thiopental der Fall. Auch für Chinidin und Imipramin erkennt man bis auf die Organe Lunge und Leber eine gute Übereinstimmung.

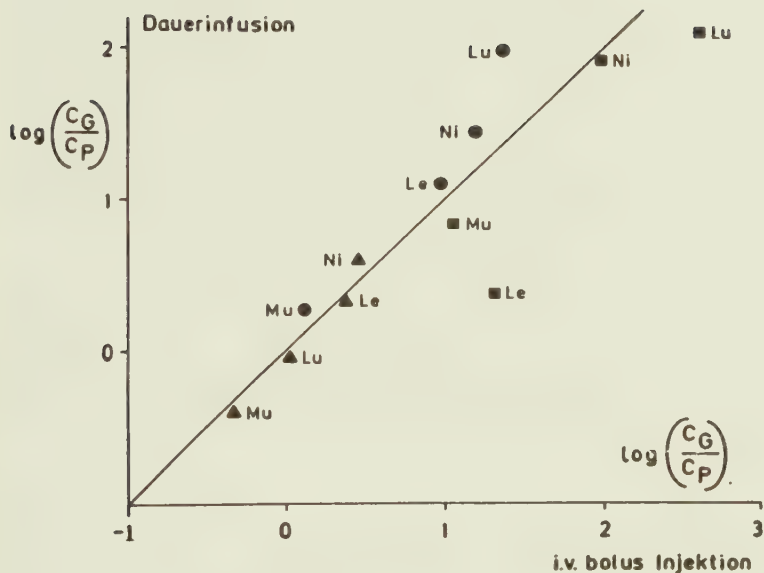
Aus Untersuchungen von Eling bzw. Stegman et al. (16, 25) geht hervor, daß die Aufnahme von Imipramin in die Gewebe von Leber und Lunge sowohl aus einem linearen Prozeß -dieser ist nicht sättigbar und konzentrationsunabhängig- als auch aus einem nicht linearen Prozeß erfolgt. Der nicht lineare Aufnahme Prozeß von Imipramin in die Lunge und Leber ist aber konzentrationsabhängig und wird folglich durch die freie Konzentration des Pharmakons im Plasma- bzw. Gewebewasser beeinflusst. Da bei beiden Versuchstypen die Gesamtkonzentration im Plasma und somit auch die freie Konzentration im Gewebewasser verschieden groß war, ist es nicht verwunderlich, daß verschieden hohe Gewebekonzentrationen und unterschiedliche Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma gemessen wurden. Damit erklärt sich auch das Abweichen der Meßpunkte von der Geraden.

Daß die Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma von Chinidin in der Lunge bei beiden Versuchstypen variieren, liegt möglicherweise auch an den starken Unterschieden in der Gewebefixierung von Chinidin (vgl. B.III.3.) und den daraus folgenden starken Streuungen der Chinidinkonzentration im Gewebe.

Überraschenderweise unterschieden sich bei den eben gezeigten Pharmaka die nach i.v. Bolus-Injektion gemessenen VK-Gewebe/Plasma nicht wesentlich von den nach Dauerinfusion gemessenen. Auch Lin et al. (97) fanden bei Verteilungsstudien von Ethoxybenzamid in der Ratte eine gute Übereinstimmung zwischen den nach Dauerinfusion und den nach i.v. Bolus-Injektion ermittelten Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma, wobei die Unterschiede in keinem Fall größer als 20 % waren.

Tab. 5: Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma von Imipramin
6 h nach i.v. Injektion
(errechnet aus den Daten über die Gewebe- und Plasmakonzentration von Imipramin 6 h nach i.v. Injektion, nach Dingell et al. (14)).

	LEBER	LUNGE	MUSKEL	NIERE
VK-Gewebe/Plasma :	21,0	380	13,0	87,0



11.2. Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma, berechnet aus den in vitro Bindungsdaten

In Tab. 6 (S. 32) sind die freien Anteile der Pharmaka nach der Dialyse (Plasma) und nach der Ultrafiltration (Gewebehomogenate) dargestellt; aus den in vitro ermittelten freien Anteilen wurden, wie unter C.IV. beschrieben, die Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma errechnet und ebenfalls in Tab. 6 aufgeführt; ferner wurde die Gewebefixierung der Pharmaka in vitro aufgeführt, ausgedrückt als Quotient aus der Gesamtkonzentration des Pharmakons im Gewebehomogenat und der freien Konzentration im Ultrafiltrat.

Bei der Untersuchung der Bindung von Pharmaka an Gewebehomogenate bzw. an Plasma spielen nicht nur die spezifischen Eigenschaften der Pharmaka und der Gewebe eine wichtige Rolle; auch die Temperatur bei der Versuchsdurchführung und die Konzentration der Pharmaka können die Bindungswerte beeinflussen.

Konzentration der Pharmaka

Bei den in vitro Bindungsstudien der Pharmaka an Plasma und Gewebe wurde eine Konzentration von 10^{-5} Mol/l gewählt, was bei einem mittleren Molekulargewicht der Arzneistoffe von 300 einer Konzentration von 3 µg/g entspricht. Diese Konzentration liegt in einer Größenordnung, die auch den in vivo erreichten Plasmakonzentrationen entspricht. Um den Einfluß der Arzneistoffkonzentration auf die Plasmabindung beurteilen zu können, sollte man sich folgendes überlegen:

die meisten sauren Pharmaka und auch Diazepam werden im Plasma vorwiegend an Albumin gebunden, welches in einer Konzentration von etwa $6 \cdot 10^{-4}$ Mol/l vorliegt. Da aber die freie Konzentration des Pharmakons bei 10^{-5} Mol/l sehr viel kleiner ist als die Konzentration des Albumins, dürfte die Bindung der Pharmaka an Albumin weitgehend konzentrationsunabhängig sein. Lediglich bei Pharmaka (Chinidin, Imipramin, Propranolol), die im Plasma ausser an Albumin auch noch an Substanzen mit geringer Bindungskapazität gebunden werden (α_1 -saures Glykoprotein, Lipoproteine),

ist eine stärkere Konzentrationsabhängigkeit der Plasmabindung zu erwarten. Da aber sowohl Literaturangaben (9, 17, 18) als auch eigene Experimente bestätigen, daß die Konzentrationen von Chinidin, Diazepam und Imipramin im linearen Bindungsbereich lagen, kann man davon ausgehen, daß dies bei den meisten untersuchten Pharmaka der Fall war.

Auch die Gewebebindung der Pharmaka erwies sich als weitgehend konzentrationsunabhängig:

es konnte gezeigt werden, daß sich die Muskelbindung einer Reihe von Pharmaka in einem weiten Konzentrationsbereich nur wenig verändert. Dies gilt nach Ludden (19) und Wosilait (20) auch für die Bindung ungeladener und anionischer Pharmaka an Leber und Lunge. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß Chinidin, Diazepam und Thiopental im Bereich von 10^{-4} - 10^{-6} Mol/l konzentrationsunabhängig an Leberhomogenate von Kaninchen gebunden werden (21). Lediglich die Bindung von Propranolol an die perfundierte Leber bzw. Lunge erfolgt durch eine Kombination aus linearer (nicht sättigbarer) und nicht linearer (sättigbarer, konzentrationsabhängiger) Bindung (16, 22, 23, 25). Selbst wenn die Bindung einiger Substanzen an Gewebe konzentrationsabhängig sein sollte, ist der Einfluß bei der Verwendung einer geringen Konzentration von 10^{-5} Mol/l nicht von Bedeutung.

Temperatur

Weil die Bindung der Pharmaka an Gewebhomogenate bei 4° C bestimmt wurde, ist zwar eine weitgehende Stabilität der Arzneistoffe gewährleistet; es stellt sich aber die Frage, inwiefern die Gewebebindung von der Temperatur abhängig ist. Soweit Untersuchungen vorliegen, haben diese gezeigt, daß die Muskelbindung einer Reihe von Pharmaka nur wenig von der Temperatur abhängt (24). Auch die Bindung von Propranolol (27) und Pentobarbital (26) an Leber, von Imipramin (28) an Lunge und von verschiedenen basischen Pharmaka an Membranen von Mitochondrien und endoplasmatischen Reticulum war weitgehend temperaturunabhängig (29).

Aus diesen Betrachtungen geht hervor, daß die zum Teil großen Unterschiede in den Bindungsdaten zwischen Plasma und Gewebe (vgl. die Quotienten C_p/C_{pf} bzw. C_g/C_{gf} in Tab. 6) sich nicht aus der Konzentrations- bzw. Temperaturabhängigkeit der Plasma- oder Gewebefindung erklären lassen, sondern durch die spezifischen Eigenschaften der Pharmaka und der Gewebe bedingt sind.

Weiterhin ist zu bedenken, daß bei den Bindungsstudien der Pharmaka an Gewebenomogenate die verwendeten Gewebe noch beträchtliche Mengen an Blut enthalten können. Folglich könnten für Pharmaka, die von Plasma sehr viel stärker gebunden werden als von Gewebe, die Bindungsdaten an Gewebenomogenate zu hoch sein. Doch der dadurch bedingte Fehler scheint nicht sehr groß zu sein. Wie Untersuchungen zeigen (24), beträgt der Blutgehalt (in Prozent vom Gewicht) nach Töten der Kaninchen im Muskel 1 - 2 %, in Leber und Niere 4 - 8 %, und in der Lunge 8 - 15 %. Wie unter B.III.1. dargestellt, fand sich aber nur eine schlechte Korrelation zwischen der Bindung der Pharmaka an Plasma und der Bindung an Muskelhomogenat, welches kaum Blut enthält. Dagegen ergaben sich enge Beziehungen zwischen der Bindung an Homogenate von Leber, Niere und Lunge und der Bindung an Muskelhomogenat. Dies wäre nicht zu erwarten, wenn die Bindung der Pharmaka an Leber, Niere und Lunge in vitro wesentlich durch eine Bindung an im Homogenat enthaltenes Plasma bedingt wäre. Da sich außerdem der Blutgehalt der bei den in vivo Versuchen entnommenen Organe nicht von dem für die in vitro Bindungsstudien verwendeten Organe unterschied, ist es möglich, die in vitro ermittelten Bindungswerte mit den in vivo gemessenen zu vergleichen.

Die Unterschiede in den Bindungsdaten zwischen Plasma und Gewebe können also auch nicht durch den Restblutgehalt in den Geweben erklärt werden, sondern sind auf Unterschiede in den spezifischen Eigenschaften von Pharmaka und Gewebe zurückzuführen.

		Plasma	Leber	Lunge	Niere	Muskel
<u>BARBITAL</u>	f	0.73	0.74	0.99	0.79	0.86
	(C _G /C _P)		0.99	0.73	0.93	0.85
	(C _G /C _{Gf})	1.37	1.35	0.98	1.27	1.17
<u>BUPHENIN</u>	f	0.44	0.050	0.10	0.13	0.19
	(C _G /C _P)		8.70	4.22	3.27	2.31
	(C _G /C _{Gf})	2.3	20.0	9.70	7.50	5.30
<u>DIAZEPAM</u>	f	0.09	0.032	0.14	0.034	0.078
	(C _G /C _P)		2.57	1.70	2.00	1.15
	(C _G /C _{Gf})	11.1	30.7	7.00	29.3	12.8
<u>CHINIDIN</u>	f	0.149	0.033	0.098	0.048	0.15
	(C _G /C _P)		4.51	1.52	3.10	0.93
	(C _G /C _{Gf})	6.7	30.3	10.2	20.7	6.20
<u>IMIPRAMIN</u>	f	0.24	0.013	0.031	0.019	0.049
	(C _G /C _P)		18.7	7.87	12.8	4.98
	(C _G /C _{Gf})	4.1	75.6	32.8	51.9	20.4
<u>PENTOBARBITAL</u>	f	0.36	0.16	0.32	0.28	0.33
	(C _G /C _P)		2.18	1.11	1.28	1.07
	(C _G /C _{Gf})	2.8	6.1	3.1	3.6	3.0

Tab. 6: Bindung von Pharmaka an Plasma und Gewebe in vitro

Legende siehe S. 32

		Plasma	Leber	Lunge	Niere	Muskel
<u>PHENOBARBITAL</u>	f	0.35	0.29	0.50	0.46	0.43
	(C _G /C _P)		1.20	0.70	0.75	0.82
	(C _G /C _{Gf})	2.9	3.43	2.00	2.15	2.33
<u>PHENYLBUTAZON</u>	f	0.025	0.23	0.36	0.28	0.30
	(C _G /C _P)		0.11	0.072	0.094	0.081
	(C _G /C _{Gf})	40.0	4.30	2.80	3.62	3.31
<u>PROPRANOLOL</u>	f	0.35	0.013	0.067	0.037	0.092
	(C _G /C _P) _r		26.5	5.15	9.32	3.75
	(C _G /C _{Gf})	2.9	76.2	15.0	27.2	10.9
<u>SALICYLSÄURE</u>	f	0.11	0.33	0.55	0.44	0.66
	(C _G /C _P)		0.33	0.20	0.25	0.17
	(C _G /C _{Gf})	9.1	2.99	1.81	2.29	1.51
<u>THIOPENTAL</u>	f	0.15	0.076	0.15	0.12	0.16
	(C _G /C _P)		1.97	0.99	1.30	0.91
	(C _G /C _{Gf})	6.7	13.2	6.60	8.71	6.10

Tab. 6: Bindung von Pharmaka an Plasma und Gewebe in vitro

f: freier Anteil der Pharmaka in Plasma (f_P) bzw. Gewebe (f_G), berechnet nach C.III.1. bzw. 2. (bezogen auf unverdünntes Homogenat);

Mittelwerte aus 3 - 5 Versuchen; V_{rel} 5 - 10 %

(C_G/C_P): Verteilungskoeffizient Gewebe/Plasma, errechnet aus den in vitro ermittelten freien Anteilen nach C.IV.

(C_G/C_{Gf}): Gewebebindung = Quotient aus Gesamtkonzentration des Pharmakons im Homogenat und freier Konzentration im Ultrafiltrat, bezogen auf unverdünntes Homogenat, berechnet nach C.III.2.

In der Spalte "Plasma" heißt der Quotient (C_P/C_{Pf}); dieser wurde durch Dialyse ermittelt und berechnet nach C.III.1.

11.3. Beziehungen zwischen der in vivo gemessenen und der aus in vitro Bindungsdaten berechneten Verteilung zwischen Plasma und Gewebe

11.3.a. Ergebnisse

Die Untersuchungen wurden durchgeführt, um herauszufinden, ob die mit Homogenaten erhaltenen Bindungsdaten für die Gewebefindung in vivo relevant sind. Sollte sich dies bewahrheiten, dann sollte es möglich sein, die Verteilung der Pharmaka zwischen Plasma und Gewebe in vivo vorherzusagen. Bei allen untersuchten Organen gab es signifikante ($p < 0,001$) Korrelationen zwischen in vivo gemessenen und aus in vitro Bindungsdaten berechneten Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma.

In den Abb. 6, 7, 8, und 9 sind für die einzelnen Organe die gemessenen und berechneten VK-Gewebe/Plasma aufgetragen; zusätzlich ist in jeder Abbildung eine hypothetische Gerade durch den Ursprung mit der Steigung 1 eingezeichnet: ist eine Vorhersage der VK-Gewebe/Plasma in vivo möglich, sollten die Punkte auf dieser Geraden liegen.

Abb. 6 zeigt für das Organ Muskel eine gute Übereinstimmung zwischen den aus in vitro Bindungsstudien berechneten und den in vivo gemessenen Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma. Daher ist es möglich, die Verteilung in vivo anhand von Ergebnissen aus in vitro Bindungsstudien in guter Näherung vorherzusagen. Das gleiche gilt für die Leber. Allerdings liegen hier die Zahlenwerte der in vivo gemessenen VK-Gewebe/Plasma für Imipramin und Propranolol niedriger, als sich auf Grund der in vitro ermittelten VK-Gewebe/Plasma erwarten ließ.

Für Lunge und Niere ist eine Korrelation zwischen gemessenen und berechneten VK-Gewebe/Plasma vorhanden; die Vorhersage der Zahlenwerte der in vivo gemessenen VK-Gewebe/Plasma ist jedoch nur begrenzt möglich. In der Niere liegen vor allem für Buphenin, Chinidin, Imipramin, Phenylbutazon, Propranolol und Thiopental die Zahlenwerte der in vivo gemessenen VK-Gewebe/Plasma höher als die aus in vitro Bindungsdaten berechneten.

Auffällig hoch sind auch die Zahlenwerte der in vivo gemessenen VK-Gewebe/Plasma von Buphenin, Chinidin, Imipramin und Propranolol in der Lunge -im Falle von Propranolol sind die gemessenen VK-Gewebe/Plasma bis zu 30 mal höher als die berechneten-, wohingegen die Zahlenwerte der in vivo gemessenen VK-Gewebe/Plasma von Diazepam in der Lunge niedriger sind als die berechneten.

Eine mögliche Fehlerquelle, die den Vergleich beider Datengruppen beeinträchtigen kann, liegt in der pH-Abhängigkeit der Arzneistoffverteilung. Bei den in vitro gemessenen Bindungsdaten kann man davon ausgehen, daß sich die nicht gebundenen Arzneistoffmoleküle gleichmäßig auf beiden Seiten der Membran verteilen können. Gemäß der Henderson-Hasselbalchschen Gleichung stellt sich in Abhängigkeit vom pH-Wert bei den ungebundenen Arzneistoffmolekülen ein Gleichgewicht zwischen der ionisierten und der nicht ionisierten Form ein. Da der pH-Wert auf beiden Seiten der Membran gleich groß ist (bei Plasma betrug der pH-Wert 7,4, bei Gewebekomponente 7,0), ist auch die Menge an ungebundenen ionisierten und nicht ionisierten Molekülen auf beiden Seiten der Membran gleich groß.

In vivo allerdings verteilen sich die ungebundenen Arzneistoffmoleküle zwischen Plasma, mit einem pH-Wert von 7,4, und Gewebe, mit einem pH-Wert von 7,0^{*}. Aus Gründen der höheren Ionisation reichern sich die sauren, nicht gebundenen Pharmaka auf seiten des Plasmawassers, die basischen auf seiten des Gewebewassers an, was zu einer Störung in der gleichmäßigen Verteilung der Arzneistoffmoleküle führt. Beispielsweise würde sich -sieht man von anderen Einflüssen ab- gemäß der Henderson-Hasselbalchschen Gleichung Propranolol 2,5 mal stärker im Gewebewasser als im Plasma anreichern, Phenylbutazon dagegen würde im Plasma in 2,5 mal größerer Menge als im Gewebewasser vorliegen.

*: Es wurde angenommen, daß der intrazelluläre pH-Wert in allen Geweben 7,0 beträgt (vgl. (91))

Bei der bisherigen Betrachtungsweise wurden die Eigenschaften der Membran außer acht gelassen. Bei der Verwendung einer Dialysemembran *in vitro* kann man davon ausgehen, daß sowohl geladene als auch ungeladene Moleküle die Membran frei passieren können. *In vivo* allerdings muß man -geht man von einer Lipidmembran aus- zunächst annehmen, daß nur die nicht ionisierten Moleküle die Membran ungehindert passieren können. Es ist aber durchaus vorstellbar, daß auch ionisierte Pharmaka durch Poren oder durch aktiven Transport die Membran durchqueren können, was *in vitro* an der Dialysemembran nicht nachvollziehbar ist. Es gibt Hinweise, daß vor allem Anionen die Zellmembran mit Hilfe von bestimmten Transportproteinen *in vivo* passieren können (92). Somit gibt es bei der Verteilung der Pharmaka *in vivo* Prozesse (aktiver Transport der Pharmaka durch die Zellmembran, pH-abhängige Verteilung), die *in vitro* nicht nachvollzogen wurden; diese mögliche Fehlerquelle ist bei eventuellen Diskrepanzen zwischen gemessenen und berechneten VK-Gewebe/Plasma in Betracht zu ziehen.

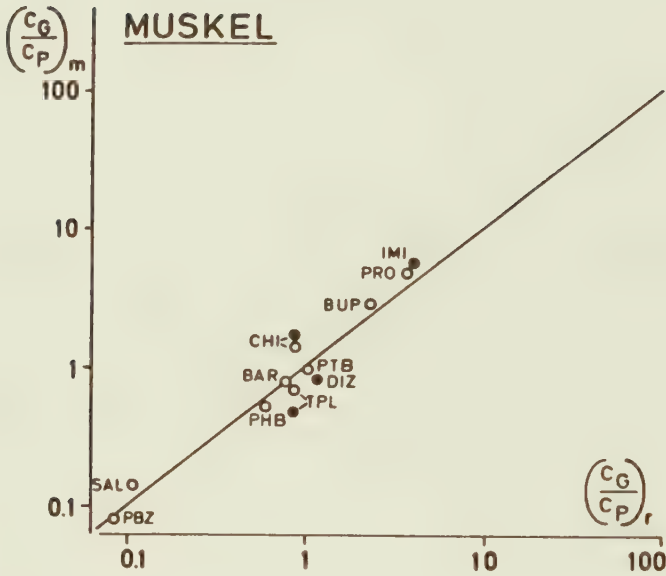


Abb. 6: Korrelation zwischen gemessenen und berechneten Verteilungs-
koeffizienten für das Organ Muskel

Legende siehe S. 40

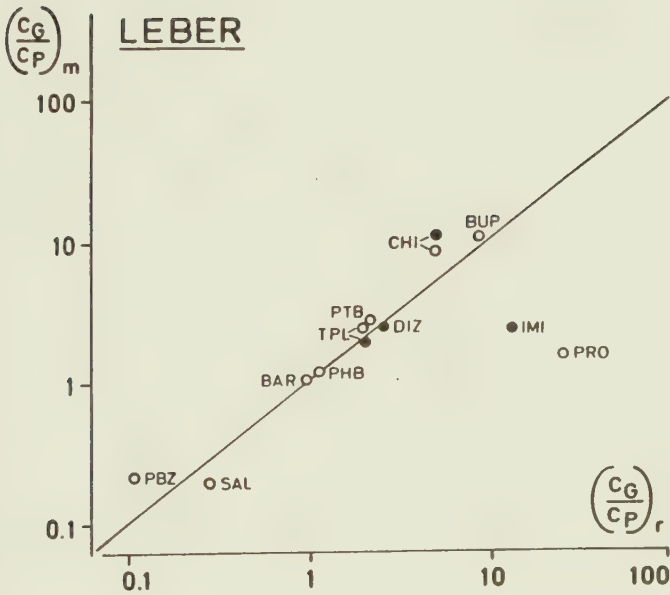


Abb. 7: Korrelation zwischen gemessenen und berechneten Verteilungskoeffizienten für das Organ Leber

Legende siehe S. 40

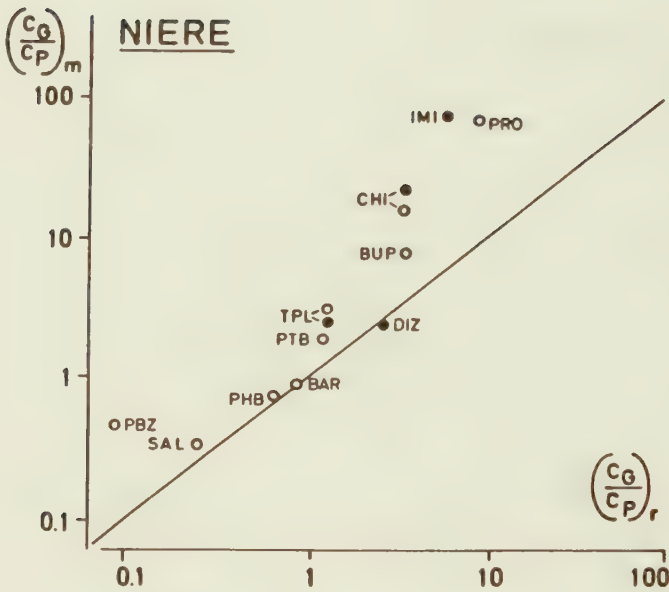


Abb. 8: Korrelation zwischen gemessenen und berechneten Verteilungskoeffizienten für das Organ Niere

Legende siehe S. 40

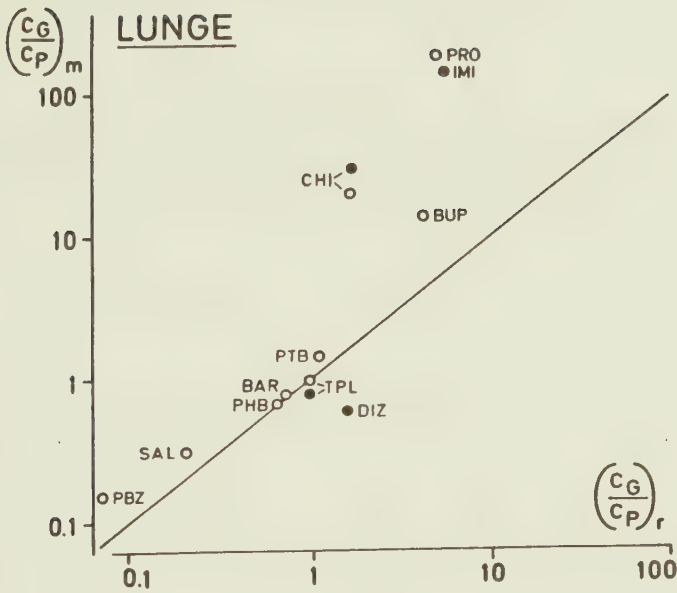


Abb. 9: Korrelation zwischen gemessenen und berechneten Verteilungskoeffizienten für das Organ Lunge

Legende siehe S. 40

Legende zu den Abbildungen 6, 7, 8, 9.

Korrelation zwischen gemessenen und berechneten Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma

- $(C_G/C_P)_m$: Verteilungskoeffizient Gewebe/Plasma, gemessen in vivo
(= Quotient aus der Gesamtkonzentration des Pharmakons im Gewebe und im Plasma; entnommen aus Tab. 3 bzw. 4, S. 20 bzw. 23)
- $(C_G/C_P)_r$: Verteilungskoeffizient Gewebe/Plasma, berechnet aus den in vitro Bindungsdaten der Pharmaka (Tab. 6, S. 32)
- : Ergebnisse, erhalten 3 h nach i.v. Bolus-Injektion des Pharmakons
 - : Ergebnisse, erhalten 5 h nach i.v. Gabe einer Initialdosis und anschließender Dauerinfusion des Pharmakons

Die eingezeichneten Linien entsprechen jeweils einer Geraden durch den Ursprung mit der Steigung 1. Im Falle völliger Übereinstimmung von gemessenen und berechneten Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma sollten die Punkte auf dieser Geraden liegen.

Abkürzungen:

BAR = Barbital; BUP = Buphenin; CHI = Chinidin; DIZ = Diazepam;
IMI = Imipramin; PBZ = Phenylbutazon; PHB = Phenobarbital;
PTB = Pentobarbital; PRO = Propranolol; SAL = Salicylsäure;
TPL = Thiopental;

Die Rangkorrelationskoeffizienten für den Zusammenhang zwischen gemessenen und berechneten Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma betrugen für

Muskel	$r_S = 0,970$
Leber	$r_S = 0,854$
Niere	$r_S = 0,981$
Lunge	$r_S = 0,975$

In allen Fällen war $p < 0,001$.

II.3.b. Diskussion

Muskel

Die Verteilung der Pharmaka zwischen Plasma und Muskel in vivo läßt sich anhand von Bindungsdaten, die mit homogenisierten Gewebe in vitro erhalten wurden, in guter Näherung vorhersagen. Diese Vorhersage ist auch -mit Ausnahme von Propranolol und Imipramin- für die Verteilung der Pharmaka zwischen Plasma und Leber möglich.

Leber

Aus Tab. 3 (S. 20) geht hervor, daß die Propranololkonzentrationen in der Leber in vivo stark streuten und erheblich niedriger lagen als in den anderen Organen. In den Untersuchungen von Schneck et al. (31) -hier wurde Propranolol der Ratte i.v. verabreicht und die Propranololkonzentration in den Geweben wurde bestimmt- finden wir eine Parallele: die niedrigste Propranololkonzentration wurde in der Leber gemessen, wobei die Konzentration noch deutlich unter der des Blutes lag; bei der Untersuchung der Mikrosomen- und Mitochondrienfraktionen von Leber, Lunge, Herz und Niere wurde nur in der Leber eine hohe Metabolisierung von Propranolol nachgewiesen. Analog fand George et al. (32) bei steady-state Versuchen mit Propranolol am Hund sehr geringe Propranololkonzentrationen in der Leber.

Aus diesen Untersuchungen geht hervor, daß Propranolol in der Leber stark metabolisiert wird. Deshalb liegt es nahe anzunehmen, daß auch die von uns in vivo gemessenen Propranololkonzentrationen in der Leber aus einem Gleichgewicht zwischen der Aufnahme des Pharmakons in die Leber und seiner gleichzeitig dort ablaufenden Metabolisierung resultieren. Entsprechend könnten die starken Streuungen der in vivo gemessenen Propranololkonzentration die von Tier zu Tier unterschiedliche Metabolisierungsrate des Arzneistoffs in der Leber widerspiegeln.

Bei isoliert perfundierten Rattenlebern fand man einen Quotienten aus Leber- und Perfusatkonzentration von 25 - 130 (27, 33); dieser Quotient entspricht sinngemäß den uns von in vitro gemessenen Bindungsdaten von Propranolol an die Kaninchenleber und liegt interessanterweise auch in der Größenordnung der von uns in vitro ermittelten Daten: $C_G/C_{Gf} = 76,2$ (vgl. Tab. 6, S. 32). Daraus geht hervor, daß die von uns mit Leberhomogenaten erhaltenen Bindungswerte von Propranolol nicht falsch waren, und daß diese nicht für die Diskrepanz zwischen in vivo gemessenen und aus in vitro Bindungsdaten berechneten Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma verantwortlich sind.

Auch bei Imipramin sind die Unterschiede zwischen gemessenen und berechneten VK-Gewebe/Plasma vermutlich auf eine rasche Metabolisierung des Pharmakons in der Leber zurückzuführen. In Übereinstimmung mit Dingell et al. (14) finden wir nach i.v. Gabe von Imipramin in der Leber sehr geringe Konzentrationen des Arzneistoffs, so daß der VK-Gewebe/Plasma Werte um 2,4 annahm. Beim Menschen findet v. Meyer (104) dagegen sehr hohe Imipraminkonzentrationen in der Leber, so daß der VK-Gewebe/Plasma Werte von 18 bzw. 21 annahm. Diese Werte stimmen gut überein mit den von uns anhand von in vitro Bindungsdaten errechneten VK-Gewebe/Plasma (in vitro (C_G/C_p) = 18,7; Tab. 6, S. 32). Daraus geht hervor, daß, im Unterschied zum Menschen, Imipramin in der Leber des Kaninchens rasch abgebaut wird. Auch die Tatsache, daß die Halbwertszeit von Imipramin beim Menschen 9,7 h (105), beim Kaninchen dagegen nur 95 min beträgt, deutet auf eine schnelle Verstoffwechselung des Arzneistoffs in der Kaninchenleber hin. Auch aus Versuchen mit der Lebermikrosomenfraktion von Kaninchen ging hervor, daß Imipramin in der Leber metabolisiert wird, wobei vermutlich als Hauptmetabolit 2-OH-Imipramin entsteht; das in geringeren Mengen gebildete Desipramin wird vermutlich sofort zu weiteren Metabolisierungsprodukten abgebaut und, ebenso wie 2-OH-Imipramin, als Glucuronid ausgeschieden (14).

Dementsprechend fanden wir bei der HPLC-Analyse von Plasma und Gewebe nur sehr geringe Mengen von Desipramin, welches allerdings beim Menschen den Hauptmetaboliten darstellt (vgl. HPLC-Chromatogramm zur Analyse des Kaninchenplasmas nach Dauerinfusion von Imipramin: C.V.3.a.)

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Unterschiede zwischen den in vivo gemessenen und den aus in vitro Bindungsdaten errechneten VK-Gewebe/Plasma von Propranolol und Imipramin in der Leber wohl auf einer im Verhältnis zur Anflutung raschen Metabolisierung der Pharmaka in der Leber in vivo beruhen.

Niere

Die hohen in vivo gemessenen Konzentrationen von Phenylbutazon und Thiopental sind eventuell zum Teil methodisch bedingt (vgl. auch die starken Streuungen der Thiopentalkonzentration in der Niere: Tab. 3 u. 4). Bei diesen Substanzen lagen die gemessenen Arzneistoffkonzentrationen im Urin rund 10 mal höher als die Konzentrationen in der Niere selbst, so daß nicht auszuschließen ist, daß durch die im Nierengewebe befindlichen Urinreste eine zu hohe Konzentration des Pharmakons im Nierengewebe vorgetäuscht wird. So ergibt sich bei Thiopental eine Korrelation zwischen seiner Konzentration im Urin und seiner Konzentration im Nierengewebe (Abb. 10).

Dagegen lassen sich die hohen Konzentrationen der untersuchten basischen Pharmaka in der Niere nicht auf diese Weise erklären. Hier lag das Verhältnis der Konzentration im Urin zur Konzentration in der Niere für Buphenin, Chinidin, Imipramin und Propranolol zwischen 0,1 und 4,0. Es kann grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden, daß die Bindungseigenschaften des intakten Nierengewebes durch Homogenisieren so verändert werden, daß die in vitro erhaltenen Bindungsdaten zu niedrig sind. Weiterhin ist zu bedenken, daß Arzneistoffe nicht nur unspezifisch an das Nierengewebe gebunden werden, sondern auch durch energieabhängige Transportvorgänge im Tubulus angereichert werden können. Zum Beispiel gibt es in den Tubuluszellen eine Reihe von Transportmechanismen für organische Säuren und Basen (Literatur bei Weiner: (34)). Da aber der renale Ausscheidungsweg beim Kaninchen bisher nicht untersucht worden ist, bleiben die vorgeschlagenen Erklärungen zunächst spekulativ.

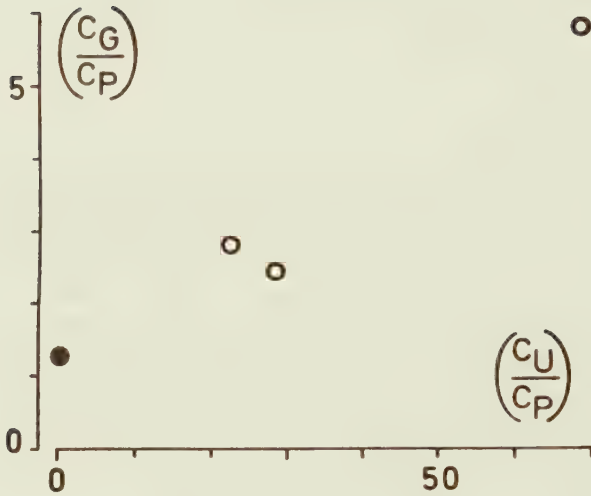


Abb. 10: Abhängigkeit der Thiopentalkonzentration im Nierengewe-
be von der Thiopentalkonzentration im Urin

(C_G/C_P) : Quotient der Konzentration in Niere und Plasma

(C_U/C_P) : Quotient der Konzentration im Urin und Plasma

Die offenen Symbole repräsentieren die *in vivo* gemessenen Werte von drei Kaninchen. Das geschlossene Symbol entspricht dem Quotienten aus Nieren- und Plasmakonzentration (C_G/C_P) , der auf Grund der *in vitro* Bindungsdaten berechnet wurde (Tab. 6, S. 32).

Lunge

Die Konzentrationen von Buphenin, Chinidin, Imipramin und Propranolol in der Lunge waren in vivo wesentlich höher, als auf Grund der in vitro gemessenen Bindung erklärt werden kann. Da die verwendeten Arzneistoffe lipophil sind und die Lunge ein gut durchblutetes Organ ist, mußte sich rasch ein Gleichgewicht einstellen zwischen der Aufnahme in und der Abgabe aus dem Lungengewebe. Wie Untersuchungen an der isoliert, perfundierten Kaninchenlunge zeigen (35, 36), erfolgt die Aufnahme amphiphiler Pharmaka (= lipophile Basen, die im physiologischen pH-Bereich eine positive Ladung tragen) ins Lungengewebe tatsächlich sehr rasch. Dabei konnte die Aufnahme von Imipramin (37, 16) in die isoliert, perfundierte Kaninchenlunge bzw. die Aufnahme von Propranolol in die isoliert, perfundierte Lunge von Ratten (22) im wesentlichen durch zwei Mechanismen beschrieben werden:

durch eine unspezifische Bindung (= temperatur- und konzentrationsunabhängiger Prozeß) und durch eine spezifische Bindung (= temperaturabhängiger und sättigbarer Prozeß).

Die spezifische Bindung läßt sich nach Junod (28) am homogenisierten Lungengewebe nicht mehr nachweisen, so daß es verständlich ist, daß die auf Grund der in vitro Bindungsdaten berechneten VK-Gewebe/Plasma niedriger sind, als die in vivo gemessenen (im Falle von Imipramin lag der Zahlenwert des berechneten VK-Gewebe/Plasma bei 7,8 gegenüber dem in vivo gemessenen, der bei 137 lag).

Dies scheint aber nicht der alleinige Grund für die aufgetretenen Diskrepanzen zu sein. Eling et al. (16) beobachteten, daß Imipramin aus der perfundierten Kaninchenlunge mit einer Halbwertszeit von 5 h nur sehr langsam abgegeben wird, und sprachen daher von einem "slowly effluxable pool" (SE-Pool). Bezeichnen-derweise konnte ein solcher SE-Pool auch für Pharmaka wie Methadon, Propranolol, Chlorphentermin und Desipramin (38, 39, 40) nachgewiesen werden. Diesen Pharmaka ist gemeinsam, daß sie lipophil sind und im Blut positiv geladen vorliegen. Sollten solche amphiphilen Stoffe, wie sie auch Chinidin, Imipramin, Propranolol und Buphenin darstellen, schnell in vivo in die Lunge

aufgenommen aber langsam abgegeben werden, ist es nicht verwunderlich, daß dort 3 bis 5 h nach Verabreichen des Pharmakons sehr hohe Konzentrationen gefunden werden.

Die These, daß sowohl die Lipophilie als auch die positive Ladung für ein Akkumulieren in der Lunge verantwortlich sind, wird unterstützt durch die Beobachtung, daß lipophile, im Blut ungeladene Stoffe (Anilin, Imidazol) oder quartäre Ammoniumbasen (Paraquat) sich nicht in der Lunge anreichern (36).

Entsprechend war die von uns in vivo in der Lunge gemessene Konzentration von Diazepam (lipophile, ungeladene Substanz) nicht hoch; sie lag sogar niedriger als man anhand der in vitro Bindungsdaten erwartet hätte. Dabei fiel auf, daß der aus Diazepam im Kaninchen gebildete Metabolit Desmethyldiazepam in der Lunge in 5,4 facher Konzentration auftrat als in Plasma, Leber, Niere, Skelett- und Herzmuskel. Angaben über die pK_a -Werte bzw. die Verteilungskoeffizienten Lipid/Wasser zeigen, daß Desmethyldiazepam sowohl etwas stärker basisch (pK_a -Wert Diazepam = 3,31; pK_a -Wert Desmethyldiazepam = 3,35) als auch etwas stärker lipophil ist (VK-Lipid/Wasser Diazepam = 630; VK-Lipid/Wasser Desmethyldiazepam = 676) (41). Beides könnte bewirken, daß Desmethyldiazepam stärker an das Lungengewebe gebunden wird und dort möglicherweise die Originalsubstanz Diazepam von den Bindungsstellen verdrängen kann. Die Erklärung des beobachteten Phänomens bleibt allerdings weiterhin spekulativ.

II.3.c. Schlußfolgerungen

An 11 Modellsubstanzen wurde untersucht, ob die Verteilung der Pharmaka zwischen Plasma und Gewebe in vivo durch die Verwendung von in vitro Bindungsdaten vorhergesagt werden kann.

Beim Muskel ist eine Vorhersage der Verteilung in vivo für alle untersuchten Pharmaka möglich. Auch andere Autoren berichten bei Prednisolon (42), bei Ethoxybenzamid (6) und bei Diazepam (9) von einer guten Übereinstimmung zwischen in vivo und in vitro ermittelten Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma im Skelettmuskel.

Bei Leber, Niere und Lunge gibt es teilweise beträchtliche Unterschiede zwischen den in vivo gemessenen und den aus in vitro Bindungsdaten berechneten VK-Gewebe/Plasma. Dies liegt unter anderem daran, daß manche Arzneistoffe (Imipramin, Propranolol) in vivo durch einen spezifischen (sättigbaren) und einem unspezifischen (konzentrationsunabhängig) Prozeß im Gewebe gebunden werden (vgl. B.II.3.b.); die spezifische Bindung läßt sich aber in vitro nicht immer nachvollziehen. Auch bei der Bindung von Prednisolon an die Kaninchenleber gibt es in vivo und in vitro unterschiedliche Bindungstypen: in vitro geht bei steigender Konzentration des Pharmakons der spezifische Prozeß in einen unspezifischen (linearen) über, wohingegen die Situation in vivo genau umgekehrt verläuft. Dieses unterschiedliche Bindungsverhalten von Prednisolon in vivo und in vitro dürfte der Grund sein, warum die in vivo gemessene Verteilung mit der durch in vitro Bindungsdaten errechneten nur schlecht übereinstimmt (42).

Bestimmte physiologische Parameter, welche die Verteilung der Pharmaka in vivo beeinflussen, können durch in vitro Bindungsstudien mit Gewebehomogenaten nicht erfaßt werden: rasche Metabolisierung der Pharmaka in der Leber; aktiver Transport amphiphiler Pharmaka in der Lunge; biliäre Rückresorption; Sekretion in der Niere usw. Dies führt zu Diskrepanzen zwischen gemessenen und berechneten Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma.

Generell läßt sich sagen, daß für amphiphile Pharmaka die Vorhersage der in vivo Verteilung zwischen Plasma und Muskel gut, die Vorhersage der in vivo Verteilung zwischen Plasma und Leber, zwischen Plasma und Lunge bzw. zwischen Plasma und Niere aber nur begrenzt möglich ist. Für nicht ionisierte (z.B. Diazepam) oder im Blut anionisch geladene Pharmaka (z.B. Barbiturate, Phenylbutazon, Salicylsäure) erscheint eine Vorhersage für alle untersuchten Organe möglich.

Diese Hypothese wird durch die Arbeiten von Lin et al. (6) unterstützt:

für Ethoxybenzamid, ein im Blut nicht ionisiertes Pharmakon, konnten für alle Organe die in vivo gemessenen VK-Gewebe/Plasma durch die in vitro errechneten vorhergesagt werden. Ebenso konnten Igari et al. (9) für Diazepam (ein im Blut nicht ionisiertes Pharmakon) von einer guten Übereinstimmung zwischen in vivo gemessenen und aus in vitro Bindungsdaten berechneten VK-Gewebe/Plasma bei Ratten berichten. Bei Prednisolon (nicht ionisiertes Pharmakon) scheinen besondere Mechanismen (konzentrationsabhängige Prozesse) bei der Verteilung zwischen Plasma und Leber bzw. Lunge bei Kaninchen mitzuspielen; für Muskel und Niere war auch hier die Vorhersage der in vivo VK-Gewebe/Plasma gut möglich. Daß Igari et al. (7) bei der Vorhersage der in vivo Verteilung von Hexobarbital, Phenobarbital und Thiopental (anionisch geladene Pharmaka) in Ratten gescheitert waren, liegt möglicherweise daran, daß die Gewebekonzentrationen der Pharmaka schon 30 min nach Injektion gemessen wurden, in einer Zeit also, in der die Verteilungsphase der Pharmaka eventuell noch nicht abgeschlossen war.

III. Beziehungen zwischen der Plasma- und Gewebefindung von Pharmaka

Wie eingangs erwähnt, wurde im "klassischen" pharmakokinetischen Modell der zeitabhängige Konzentrationsverlauf des Pharmakons im Organismus meist mit Hilfe von Kompartimentmodellen beschrieben, die den Nachteil haben, daß die darin verwendeten Kompartimente auf fiktiven Größen beruhen. In den letzten Jahren hat man versucht, physiologisch-pharmakokinetische Modelle zu entwickeln, die weitgehend auf realen Gewebepolumina bzw. Durchblutungsgrößen und Bindungsparametern basieren. Da aber die zur Entwicklung solcher Modelle benötigten Daten zur Gewebefindung weitgehend fehlten, wurde verschiedentlich versucht, die Daten für die Plasmabindung zur Vorhersage der Gewebefindung zu benutzen (1, 42, 53). Um herauszufinden, ob eine Extrapolation der Plasmabindung auf die Gewebefindung gerechtfertigt ist, wurden bei den elf untersuchten Pharmaka die Daten der Plasmabindung mit den Daten der Gewebefindung verglichen. Dabei stellt sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen der Bindung an Plasmaproteine und der Bindung an Gewebe gibt, und ob sich in vitro gefundene Zusammenhänge auch in vivo bestätigen lassen.

Als Maß für die Bindung wurde jeweils der Quotient Ges.Konz.Gewebe/freie Konz.Plasma angegeben; bei den in vivo ermittelten Bindungsdaten wurde davon ausgegangen, daß im Gleichgewicht die freie Konzentration im Gewebewasser genauso groß ist wie im Plasmawasser.

III.1. Beziehungen zwischen der Plasmabindung und der Bindung an Muskelgewebe

In Abb. 11 sind die in vitro gemessenen Daten für die Muskelbindung bzw. für die Plasmabindung der einzelnen Pharmaka logarithmisch dargestellt. Das Organ Muskel wurde als Modell herausgegriffen, weil es auf Grund seiner großen Menge (40 % des Körpergewichts) für die Bindung der Pharmaka von großer Bedeutung ist.

Außerdem verhält sich der Muskel -wie bisher dargestellt- bezüglich der Bindung der Pharmaka am "überschaubarsten" (geringe Temperatur- und Konzentrationsabhängigkeit der Bindung).

Betrachtet man alle untersuchten Substanzen zusammen, besteht offenbar kein Zusammenhang zwischen der Bindung an Muskelgewebe und der Bindung an Plasmaproteine *in vitro*. Auch ein Vergleich der *in vivo* Bindungsdaten führt zum selben Ergebnis: die Punkte in Abb. 12 lassen insgesamt betrachtet keinen Zusammenhang erkennen.

Auffällig ist, daß bei den einzelnen Pharmaka die Bindungsdaten von Plasma und Gewebe zum Teil stark differieren (z.B. Phenylbutazon: $C_P/C_{Pf} = 40$; $C_G/C_{Gf} = 3,3$; *in vitro*). Das könnte daran liegen, daß *in vitro* die Bindung der einzelnen Pharmaka nur bei einer Konzentration gemessen wurde (10^{-5} Mol/l). Da diese Konzentration aber meist im therapeutischen Bereich lag, und weil in diesem Bereich die Plasmabindung und auch die Muskelbindung wenig konzentrationsabhängig sind (vgl. B.II.2.), ist ein Vergleich der Daten dennoch sinnvoll.

Offenbar ist eine Extrapolation der Plasmabindung auf die Bindung an Muskelgewebe nicht gerechtfertigt. Wahrscheinlich werden die meisten Pharmaka im Plasma an Albumin oder an Lipoproteine gebunden (43, 44, 45). Dagegen ist die Bindung an Gewebe eher unspezifisch und wird nicht wesentlich von der Bindung an das auch im Gewebe vorhandene Albumin bestimmt. Dies wird verständlich, wenn man bedenkt, daß sich in 100 ml Plasma etwa 4 g Albumin, in 100 g Gewebe dagegen nur 0,4 g Albumin befinden (vgl. Angaben über den Albumingehalt im Gewebe von Kaninchen (42)).

Es ist aber nicht auszuschließen, daß innerhalb von Gruppen ähnlicher chemischer Struktur (z.B. Barbiturate) ein Zusammenhang zwischen der Bindung an Plasma und an Muskelgewebe besteht. Die Tatsache, daß in den Abb. 11 und 12 die Meßpunkte von Barbital, Phenobarbital, Pentobarbital und Thiopental auf einer "gedachten Geraden" liegen, deutet darauf hin.

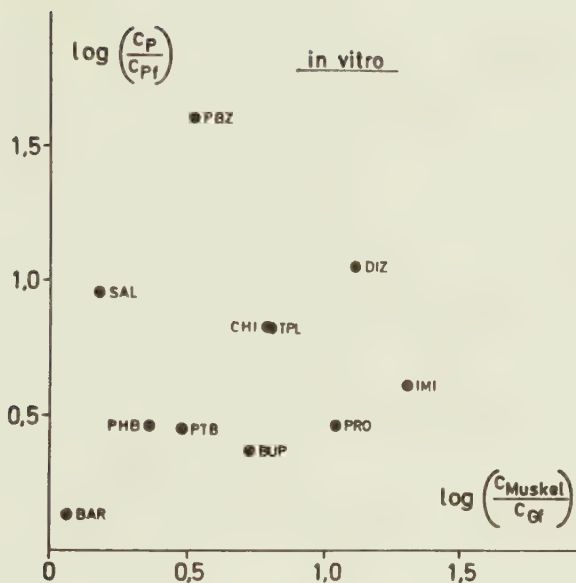


Abb. 11: Beziehungen zwischen der Bindung von Pharmaka an Plasma und an Muskelgewebe in vitro

Ordinate: Plasmabindung, ausgedrückt als $\log (C_p/C_{pf})$

Abszisse: Bindung an Muskelgewebe, ausgedrückt als $\log (C_{\text{Muskel}}/C_{\text{Gr}})$

Die Quotienten sind aus Tab. 6 (S. 32) entnommen.

Zwischen Plasmabindung und Bindung an Muskelgewebe in vitro besteht kein Zusammenhang: $r_s = 0,34$ (nicht signifikant).

BAR = Barbitol; BUP = Buphenin; CHI = Chinidin; DIZ = Diazepam;
IMI = Imipramin; PBZ = Phenylbutazon; PHB = Phenobarbital;
PTB = Pentobarbital; PRO = Propranolol; SAL = Salicylsäure;
TPL = Thiopental.

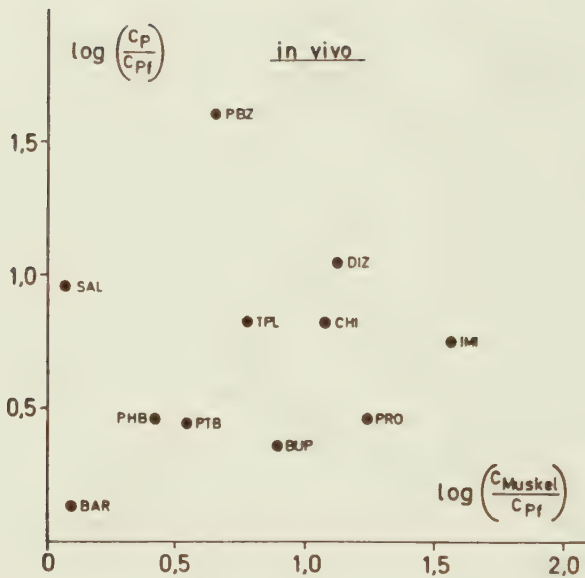


Abb. 12: Beziehungen zwischen der Bindung von Pharmaka an Plasma und an Muskelgewebe in vivo

Ordinate: Plasmabindung, ausgedrückt als $\log \left(\frac{C_p}{C_{pf}} \right)$

Abszisse: Bindung an Muskelgewebe, ausgedrückt als $\log \left(\frac{C_{\text{Muskel}}}{C_{pf}} \right)$

Die Quotienten sind aus Tab. 3 und 4 (S. 20 bzw. 23) entnommen.

Zwischen Plasmabindung und Bindung an Muskelgewebe in vivo besteht kein Zusammenhang: $r_s = 0,18$ (nicht signifikant)

Abkürzungen siehe Abb. 11 (S. 51)

III.2. Beziehungen zwischen der Bindung an Leber, Lunge und Niere

Um herauszufinden, ob Beziehungen zwischen der Bindung von Pharmaka an Plasma und der Bindung an Leber, Lunge und Niere existieren, wurden für alle untersuchten Pharmaka die *in vitro* ermittelten Daten der Gewebefindung mit den Daten für die Plasmapindung verglichen. Wie beim Muskel ergibt sich, daß die Plasmapindung auch nicht mit der Bindung an Leber, Lunge und Niere korreliert. Vergleicht man analog die *in vivo* gemessenen Bindungsdaten, kommt man zum gleichen Ergebnis. Tab. 7 und 8 zeigen, daß sowohl *in vitro* als auch *in vivo* keine signifikanten Beziehungen zwischen der Plasma- und der Gewebefindung existieren.

Dagegen ergaben sich *in vitro* und *in vivo* enge Korrelationen zwischen der Bindung der Pharmaka an die Gewebe von Leber, Lunge, Niere und Muskel (vgl. Tab. 7 und 8). Die Abb. 13 und 14 zeigen, daß zwischen den verschiedenen Geweben sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine enge Beziehung besteht bezüglich der Fähigkeit, Pharmaka zu binden.

Die Tatsache, daß sich die Meßpunkte von Pharmaka mit so unterschiedlichen pK_a -Werten, verschiedenen Lipid-Wasser-Verteilungskoeffizienten und verschiedener chemischer Struktur um gemeinsame Regressionslinien verteilen, legt die Vermutung nahe, daß den verschiedenen Geweben ein gemeinsamer, dominanter Bindungsmechanismus zu eigen ist: die Pharmaka werden hauptsächlich unspezifisch an makromolekulare Gewebestrukturen wie Zellkerne (46), Nukleinsäuren (47), Mukopolysaccharide (48), Mikrosomen (50), Lipide (51) und cytoplasmatische Proteine gebunden.

Da Albumin auch im Gewebe vorkommt, wurde von verschiedenen Autoren (53, 42) versucht, die Gewebefindung der Pharmaka durch die Bindung an das Albumin zu erklären. So versuchten Khalafallah et al. (42) anhand der Bindung von Prednisolon an das Plasmaalbumin die Gewebefindung *in vivo* vorherzusagen; dabei lagen die Zahlenwerte der vorhergesagten Bindungsdaten um mehr als die Hälfte niedriger als die *in vivo* gemessenen. Auch Goldbaum et al. (100) fanden, daß sich die von ihnen untersuchten Barbiturate in den Geweben so stark anreichern, daß dies durch die Bindung an das Albumin alleine nicht erklärt werden kann.

Schon die Tatsache, daß das Albumin im Gewebe in wesentlich geringerer Konzentration als im Plasma vorkommt (vgl. S. 50), gibt Anlaß zu vermuten, daß das Albumin bei der Gewebefindung von Pharmaka keine bedeutende Rolle spielt.

Legende zu Abb. 13:

Beziehungen zwischen der Bindung von Pharmaka an Gewebe in vitro

Dargestellt wurde die Bindung an Leber und Niere bzw. Lunge und Muskel in vitro, ausgedrückt als $\log (C_G/C_{Gf})$, entnommen aus Tab. 6 (S. 32)

Die Korrelationskoeffizienten sind in Tab. 7, S. 57 aufgeführt. In jeder Abbildung ist außerdem die Regressionsgerade eingezeichnet.

BAR = Barbitol; BUP = Buphenin; CHI = Chinidin; DIZ = Diazepam;
IMI = Imipramin; PBZ = Phenylbutazon; PHB = Phenobarbital;
PTB = Pentobarbital; PRO = Propranolol; SAL = Salicylsäure;
TPL = Thiopental.

Legende zu Abb. 14:

Beziehungen zwischen der Bindung von Pharmaka an Gewebe in vivo

Dargestellt wurde die Bindung an Leber und Niere bzw. Lunge und Muskel in vivo, ausgedrückt als $\log (C_G/C_{Pf})$, entnommen aus Tab. 3 und 4 (S. 20 bzw. 23)

Die Korrelationskoeffizienten sind in Tab. 8, S. 57 aufgeführt. In jeder Abbildung ist außerdem die Regressionsgerade eingezeichnet.

Abkürzungen wie oben.

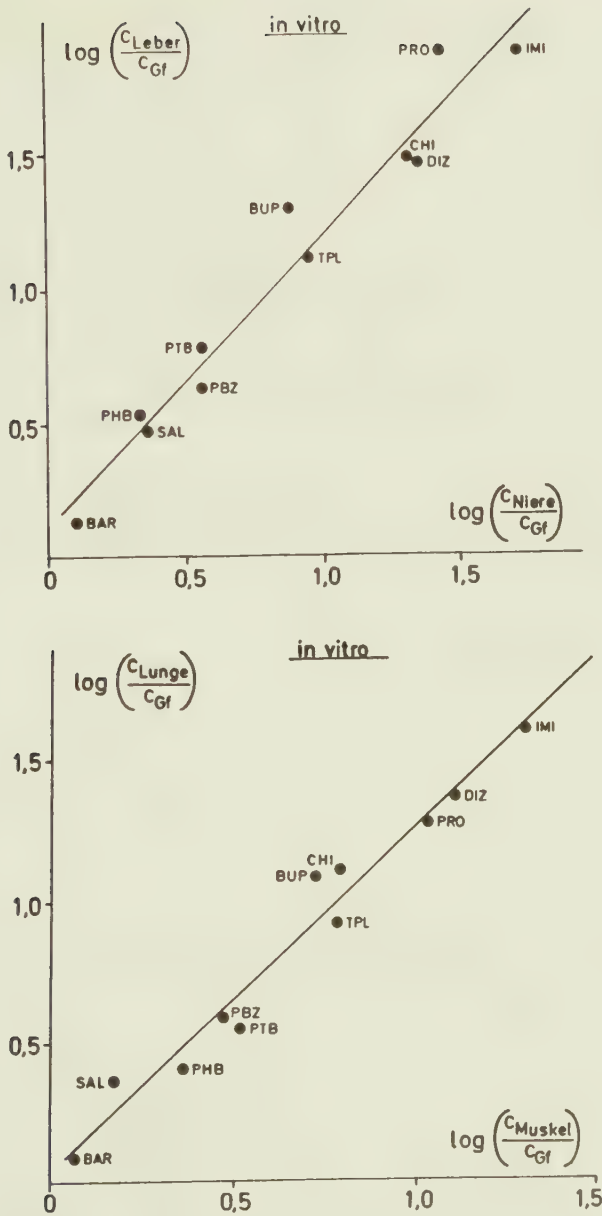


Abb. 13: Beziehungen zwischen der Bindung von Pharmaka an Leber, Lunge, Niere und Muskel in vitro
Legende siehe S. 54

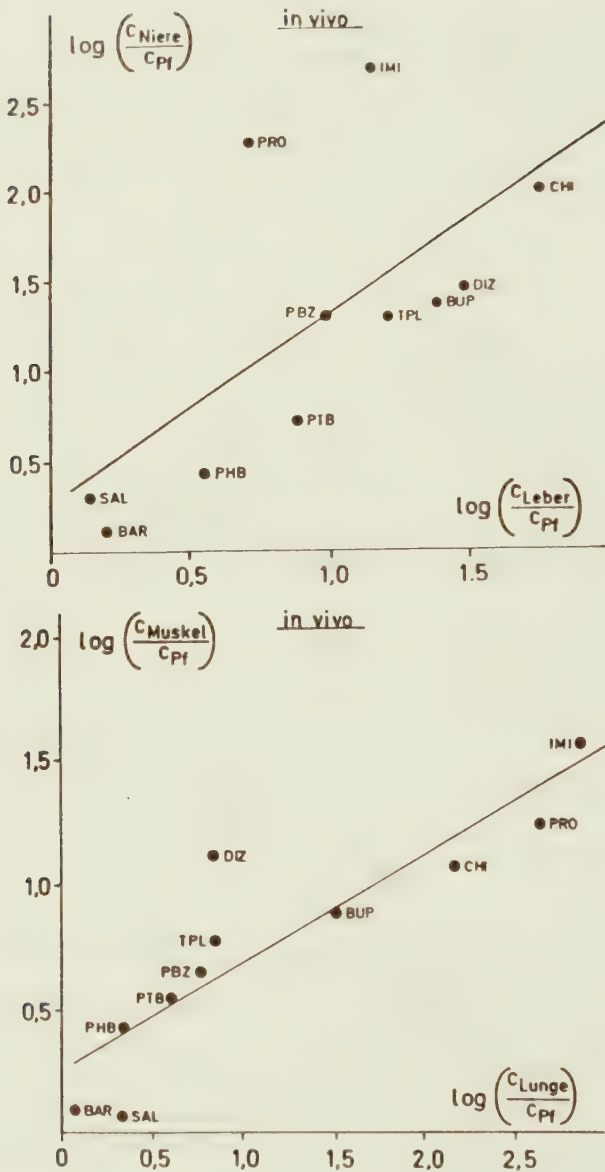


Abb. 14: Beziehungen zwischen der Bindung von Pharmaka an Leber, Lunge, Niere und Muskel in vivo

Legende siehe S. 54

NIERE	LUNGE	MUSKEL	PLASMA	
0,96 [*]	0,95 [*]	0,94 [*]	0,14 n.s.	LEBER
	0,97 [*]	0,98 [*]	0,31 n.s.	NIERE
		0,98 [*]	0,22 n.s.	LUNGE
			0,34 n.s.	MUSKEL

Tab. 7: Korrelationskoeffizienten für die Beziehung zwischen der Gewebe- und Plasmabindung von Pharmaka in vitro

angegeben ist jeweils der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman;

n.s.: nicht signifikant

* : signifikant für $p < 0,001$

Verglichen wurden die Daten für die Plasmabindung (C_p/C_{pf}) und für die Gewebefindung (C_g/C_{gf}) aus Tab. 6 (S. 32)

NIERE	LUNGE	MUSKEL	PLASMA	
0,71 ⁺	0,65 ⁺	0,67 ⁺	0,29 n.s.	LEBER
	0,95 [*]	0,96 [*]	0,26 n.s.	NIERE
		0,94 [*]	0,13 n.s.	LUNGE
			0,18 n.s.	MUSKEL

Tab. 8: Korrelationskoeffizienten für die Beziehung zwischen der Gewebe- und Plasmabindung von Pharmaka in vivo

angegeben ist jeweils der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman;

n.s.: nicht signifikant

* : signifikant für $p < 0,001$

+ : signifikant für $p < 0,025$

Verglichen wurden die Daten für die Plasmabindung (C_p/C_{pf}) und für die Gewebefindung (C_g/C_{pf}) aus Tab. 3 und 4 (S. 20 bzw. 23)

III.3. Besonderheiten bei der Plasma- und Gewebefindung von Chinidin in vivo

Daß es beim Menschen große interindividuelle Unterschiede in der Plasmabindung von Chinidin gibt, ist bislang bekannt. Kates et al. (54) fanden Werte zwischen 51 und 87 %-Bindung. Auch Guentert und ~~Die~~ (55) berichten in einer pharmakokinetischen Studie am Kaninchen von großen interindividuellen Schwankungen bei der Plasmabindung von Chinidin; darüber hinaus berichten sie erstmals von einer Beziehung zwischen dem Verteilungsvolumen, bezogen auf die im Plasma ungebundene Substanz, und der Plasmabindung von Chinidin. Betrachtet man die Ergebnisse einer weiteren pharmakokinetischen Studie dieses Arbeitskreises (12), so ergibt sich auch hier ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem freien Anteil von Chinidin im Plasma und dem Verteilungsvolumen. Da ein hohes Verteilungsvolumen auch auf eine Gewebefindung der Substanz schließen läßt, haben Guentert et al. (55) vermutet, daß bei Chinidin ein Zusammenhang zwischen der Bindung an Plasma und der Bindung an Gewebe besteht.

Wir haben deshalb für jedes Versuchstier die von uns in vivo gemessenen Daten für die Plasmabindung und für die Gewebefindung miteinander verglichen. Dabei ergab sich zum einen, daß die Plasmabindung von Tier zu Tier stark streute (die Bindungswerte lagen zwischen 81,4 % und 94,0 %); zum anderen ergab sich bei den einzelnen Versuchstieren ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Plasmabindung und der Bindung an die einzelnen Gewebe (Abb. 15).

Somit sind unsere Ergebnisse der Beweis für die von Guentert et al. (55) aufgestellte Vermutung, daß es bei Chinidin einen Zusammenhang zwischen der Plasma- und Gewebefindung gibt.

Dies beinhaltet zum einen, daß es große interindividuelle Streuungen bei der Plasma- und Gewebefindung gibt, und zum anderen läßt sich sagen, daß einer hohen Plasmabindung eine hohe Gewebefindung parallel läuft, und umgekehrt.

Sucht man nach einer Erklärung für das beobachtete Phänomen, könnte man zunächst an das Albumin als "Bindungsindikator" denken, weil es ein Protein ist, das gleichzeitig in Plasma und Gewebe vorkommt. Da Albumin, verglichen mit dem Plasma, im Gewebe aber nur in geringer Konzentration vorkommt (vgl. S. 50), und da Chinidin im Plasma außer an Albumin auch noch in größerer Menge an Lipoproteine (56) gebunden vorliegt, ist diese Erklärung nicht ganz befriedigend.

Ähnlich wie Chinidin verhält sich Warfarin in Ratten: auch hier konnte neben deutlichen interindividuellen Schwankungen der Serum-eiweißbindung eine Korrelation zwischen der Bindung an Serum und dem Verteilungsvolumen festgestellt werden (58). Bei näherer Betrachtung ergab sich auch eine Korrelation zwischen der Serum-eiweißbindung von Warfarin und der Bindung an das Lebergewebe der Ratten. Doch waren weder der Gehalt an Albumin noch der Gehalt der Gesamtproteine im Plasma für die beobachteten interindividuellen Streuungen und für die Korrelation verantwortlich. Ob der Gehalt an bestimmten Proteinen oder ob andere Faktoren (z.B. verschiedene genetisch bedingte Konfiguration der Proteine oder das Vorhandensein endogener Verdrängersubstanzen) für den Zusammenhang zwischen Gewebe- und Plasmabindung verantwortlich sind, bleibt weiterhin spekulativ.

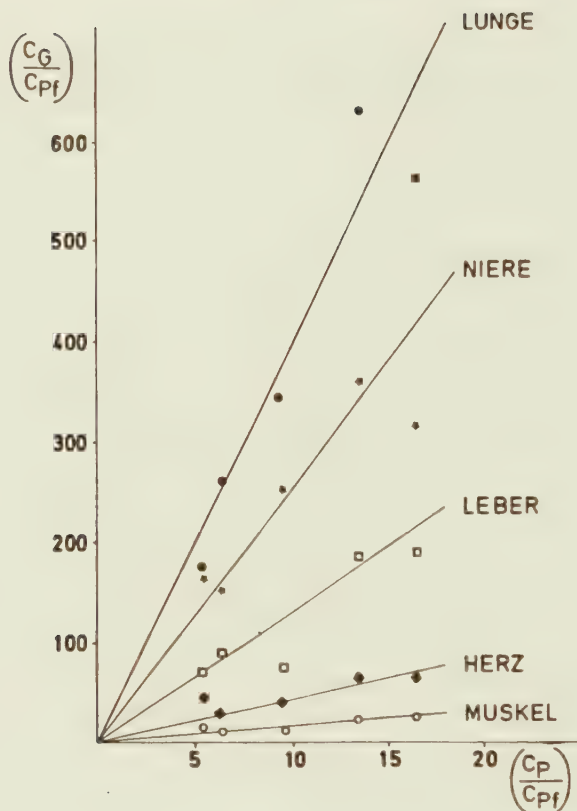


Abb. 15: Korrelation zwischen der Bindung an Plasma und an Gewebe von Chinidin bei Kaninchen

Ordinate: Gewebebindung, ausgedrückt als $\left(\frac{C_G}{C_{Pf}}\right)$

Abszisse: Plasmabindung, ausgedrückt als $\left(\frac{C_P}{C_{Pf}}\right)$

Die senkrecht übereinanderliegenden Meßpunkte repräsentieren die Bindungsdaten von jeweils einem Versuchstier.

Die Daten sind Ergebnisse aus den Verteilungsstudien nach Dauerinfusion (Tab. 4, S. 23). Für $p < 0,05$ ergaben sich signifikante Beziehungen zwischen Gewebe- und Plasmabindung: die Rangkorrelationskoeffizienten sind 0,92 (Lunge), 0,89 (Niere), 0,92 (Leber), 0,85 (Herz), 0,81 (Muskel).

IV. Spezielle Untersuchungen zur Bindung der Pharmaka im Muskelgewebe

IV.1. Einfluß der Muskelarten

Wie schon erwähnt, kommt dem Muskel auf Grund seines großen Anteils am Körpergewicht eine besondere Bedeutung zu bei der Bindung der Arzneistoffe. Wegen der verschiedenen Funktion und Zusammensetzung der Muskel könnte man Unterschiede im Bindungsverhalten erwarten: beispielsweise unterscheiden sich die roten Muskelfasern, die für die langsame und länger dauernde Kontraktion verantwortlich sind, von den weißen vor allem durch einen höheren Gehalt an Myoglobin (Sauerstoffspeicher im Muskel), an Fetten und an Lipasen (60); verglichen mit dem weißen Muskel zeigt der Herzmuskel vor allem einen höheren Gehalt an Phospholipiden (61).

Um der Frage nachzugehen, ob sich der Muskel bezüglich der Bindung von Pharmaka wie ein einheitliches Kompartiment verhält, wurden bei den Verteilungsstudien von Chinidin, Diazepam, Imipramin und Thiopental auch die Konzentrationen im Herzmuskel, im Zwerchfell, im roten Muskel (musculus adductor) und weißen Muskel (musculus psoas, musculus vastus medialis) gemessen. Es wurde für jedes Pharmakon überprüft, ob sich in der Bindung an die verschiedenen Muskelarten signifikante Unterschiede ergeben.

Beim Betrachten von Tab. 9 zeigt sich, daß es bei den untersuchten basischen Pharmaka (Chinidin, Diazepam, Imipramin) Unterschiede zwischen der Bindung an roten und weißen Muskel bzw. zwischen weißen Muskel und Zwerchfell (Diazepam ausgenommen) gibt. Dagegen bestehen bei keinem der untersuchten Stoffe signifikante Unterschiede zwischen der Bindung an das Zwerchfell und an den roten Muskel. In den roten Muskelfasern ist der Myoglobingehalt höher als in den weißen; da die Gesamtkonzentration der Pharmaka im roten Muskel höher war als im weißen, werden die Pharmaka in den roten Muskelfasern

vermutlich an das dort vermehrt vorkommende Myoglobin gebunden. Bekanntermaßen werden viele Pharmaka an das Hämoglobin gebunden (94, 95). Da das Myoglobin dem Hämoglobin strukturell sehr ähnlich ist -beide besitzen das Häm als prosthetische Gruppe-, ist es vorstellbar, daß auch das Myoglobin in der Lage ist, Pharmaka zu binden.

Das Zwerchfell verhält sich bezüglich der Bindung von Pharmaka ähnlich wie der rote Muskel: die Gesamtkonzentration der Arzneistoffe war etwa gleich.

Der Herzmuskel dagegen scheint die untersuchten Pharmaka stärker zu binden als der Skelettmuskel (die Gesamtkonzentrationen waren höher). Dies dürfte letztlich auf seiner spezifischen Funktion und der damit verbundenen spezifischen biochemischen Zusammensetzung beruhen: beispielsweise ist der Gehalt an Phospholipiden im Herzmuskel des Kaninchens 20,9 %, im Skelettmuskel 15,5 % (63).

		CHINIDIN	DIAZEPAM	IMIPRAMIN	THIOPENTAL
M. rot	- M. weiß	**	**	**	n.s.
Zwerchfell	- M. rot	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Zwerchfell	- M. weiß	*	n.s.	*	n.s.
Herz	- M. rot	*	*	*	/
Herz	- M. weiß	***	*	*	/
Herz	- Zwerchfell	***	n.s.	*	/

Tab. 9: Unterschiede in der Pharmakonverteilung zwischen verschiedenen Muskelarten

*** : signifikant für $p < 0,001$

** : signifikant für $0,001 < p < 0,01$

* : signifikant für $0,01 < p < 0,05$

n.s. : nicht signifikant ($p > 0,05$)

M. : Muskel

/ : die Thiopentalkonzentration im Herzmuskel wurde nicht gemessen

Die Daten wurden unter Verwendung des t-Test für verbundene Stichproben ermittelt - nach Sachs (62).

Bei Chinidin waren die Unterschiede zwischen der Bindung an weißen Muskel und Herzmuskel sehr groß ($p < 0,001$). Um festzustellen, ob sich diese Beobachtung auch *in vitro* nachvollziehen läßt, haben wir die Bindungsdaten von Chinidin an Gewebehomogenate von weißen Muskel und Herzmuskel bestimmt (nach C.III.2.) Aus Tab. 10, wo die Bindungsdaten der *in vivo* und der *in vitro* Versuche gegenübergestellt wurden, geht hervor, daß Chinidin auch *in vitro* erheblich stärker an Herzmuskel als an weißen Muskel gebunden wird.

	IN VIVO	IN VITRO
Herzmuskel	42,1	33,0
weißer Muskel	9,5	6,2

Tab. 10: Bindung von Chinidin an Herzmuskel und weißen Muskel

Die Bindung wurde ausgedrückt als Quotient aus Gesamtkonzentration und freier Konzentration:

in vivo: (C_G/C_{Pf}) - vgl. auch Tab. 4 (S. 23)

in vitro: (C_G/C_{Gf}) - vgl. auch Tab. 6 (S. 32); Daten bezogen auf unverdünntes Homogenat, ermittelt durch Ultrafiltration nach C.III.2.

Die Bindungsdaten der Tab. 10 stimmen gut mit den Ergebnissen von Harashima et al. (64) überein: nach i.v. Gabe von Chinidin wurde im Rattenherzmuskel ein Quotient (C_G/C_{Pf}) von 45,8 gemessen, wohingegen der Quotient (C_G/C_{Pf}) von weißen Muskel mit 11,3 ebenfalls deutlich niedriger lag. Das unterschiedliche Bindungsverhalten zwischen Herzmuskel und weißen Muskel konnte auch hier *in vitro* bestätigt werden.

Der Grund für das unterschiedliche Bindungsverhalten könnte theoretisch darin liegen, daß Chinidin im Herzmuskel durch einen spezifischen Bindungsprozeß angereichert wird. Da aber am Herzmuskelhomogenat von Ratten gezeigt werden konnte (65), daß die Bindung von Chinidin linear verläuft, kann diese Hypothese weitgehend ausgeschlossen werden. Bekanntlich ist zwar der Gesamtfettgehalt im Herzmuskel niedriger als im Skelettmuskel (19,3 % gegenüber 27,8 %, nach Rauen, Biochem. Taschenbuch (61)), es besteht aber ein Unterschied in der Fettzusammensetzung: der Gehalt an Phospholipiden - vor allem Phosphatide wie Kephalin- ist im Herzmuskel deutlich höher als im Skelettmuskel. Die Schlußfolgerung, daß der erhöhte Phospholipidgehalt für die höhere Bindung im Herzmuskel verantwortlich sei, ist deshalb naheliegend. Unterstützt wird diese Hypothese durch Studien von Harashima et al. (64), die durch Bindungsversuche mit Chinidin an Leberhomogenaten herausgefunden haben, daß die für die Bindung von Chinidin verantwortlichen Makromoleküle in der Regel die Phospholipide sind.

IV.2. Einfluß der Lipophilie der Pharmaka

In der Literatur finden sich des öfteren Hinweise, daß die Lipophilie der Pharmaka einen positiven Einfluß auf die Plasmabindung habe (67, 68, 69). Auch für die Bindung an Muskelgewebe gibt es Untersuchungen, die einen solchen Einfluß vermuten lassen (70, 71, 72, 73).

Im allgemeinen dient der Verteilungskoeffizient Lipid/Wasser als Maß für die Lipophilie einer Substanz; dabei wird für die lipophile Phase meist Oktanol verwendet (99, 102), weil sich damit die besten Korrelationen zur Proteinbindung ergeben.

Es wurde untersucht, welcher Zusammenhang zwischen dem Verteilungskoeffizienten Oktanol/Puffer der einzelnen Pharmaka (vgl. Tab. 1, S. 11) und der Bindung an das Muskelgewebe besteht. Dabei ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem

VK-Oktanol/Puffer und der Bindung an das Muskelgewebe in vivo (Abb. 16); dagegen zeigte sich eine schwache Korrelation zwischen dem VK-Oktanol/Puffer und der Bindung an das Muskelgewebe in vitro ($r_s = 0,58$).

Dabei ist zu bedenken, daß der Verteilungskoeffizient Lipid/Wasser stark vom Ionisationsgrad der untersuchten Stoffe abhängt. Dieser streute bei den von uns untersuchten Pharmaka jedoch erheblich: Ionisationsgrad von Diazepam ~ 0 %, Barbiturate 30 - 50 %, Imipramin und Propranolol > 95 %.

Verschiedentlich wurde angenommen, daß die Lipophilie der entscheidende Faktor für die Bindung eines Pharmakons an Proteine sei ; deshalb wurde gefordert, die VK-Lipid/Wasser nur für die nicht ionisierten Moleküle zu berechnen (67, 101, 102).

Wir haben darum die von uns gemessenen VK-Oktanol/Puffer für die nicht ionisierte Substanz VK^* wie folgt aus dem bei pH 7 ermittelten $VK_{7,0}$ berechnet:

$$VK^* = F \cdot VK_{7,0}$$

F ergibt sich aus der Henderson-Hasselbalchschen Beziehung, wobei gilt:

$$\text{für Säuren} \quad F_S = 1 + 10^{pH - pK_a}$$

$$\text{für Basen} \quad F_B = 1 + 10^{pK_a - pH}$$

Von der Überlegung ausgehend, daß nur die nicht ionisierten Moleküle gebunden werden, hat Rekker (103) vorgeschlagen, auch die Bindungsdaten der Pharmaka für den Ionisationsgrad zu korrigieren; dann würden die Korrelationen zwischen den Bindungsdaten und den Verteilungskoeffizienten* Lipid/Wasser noch besser. Deshalb haben wir die Bindungsdaten der Pharmaka an Muskelgewebe in vivo und in vitro für den ionisierten Anteil wie folgt korrigiert:

$$\text{Muskelbindung in vivo : } (C_G/C_{Pf})^* = (C_G/C_{Pf}) \cdot F \quad (\text{Tab. 3 und 4})$$

$$\text{Muskelbindung in vitro: } (C_G/C_{Gf})^* = (C_G/C_{Gf}) \cdot F \quad (\text{Tab. 6})$$

Wie in Abb. 17 dargestellt, ergibt sich nach Korrektur für den ionisierten Anteil ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Verteilungskoeffizienten Oktanol/Puffer und der Bindung an das Muskelgewebe *in vivo*. Auch beim Vergleich der *in vitro* Bindungsdaten konnte die Korrelation leicht verbessert werden ($r_s = 0,62$). Berechnet man aus den Korrelationskoeffizienten r der beiden nach Korrektur entstandenen Beziehungen das Bestimmtheitsmaß r^2 , so läßt sich daraus ableiten, daß in der Regel nur 46,2 % (*in vivo*) bzw. 41,0 % (*in vitro*) der Bindung an das Muskelgewebe von der Lipophilie der Pharmaka bestimmt werden (*in vivo*: $r = 0,68$; *in vitro*: $r = 0,64$). Daneben können andere Bindungskräfte wie z.B. elektrostatische Wechselwirkungen (Dipol-Dipol-Wechselwirkung, Ionenbindung) in Betracht kommen.

Dies steht in Einklang mit der Beobachtung, daß die Korrelation zwischen der Bindung von Pharmaka an Gewebehomogenate und dem VK-Lipid/Wasser besser ist, wenn die organische Lösungsmittelkomponente bei der Bestimmung der VK-Lipid/Wasser sauerstoffhaltig war: bei der Verwendung von Diäthyläther, Amylacetat oder n-Oktanol waren die Korrelationen besser als bei Verwendung von Heptan, Tetrachlorkohlenstoff oder Benzol (70). Dies deutet darauf hin, daß die Wasserstoffbrückenbindung bei der Verteilung der Pharmaka zwischen wässrigen Medium und Gewebestrukturen eine bedeutende Rolle spielt.

Betrachtet man die Gruppe der Barbiturate (Barbital, Phenobarbital, Pentobarbital, Thiopental) getrennt, so ergeben sich noch bessere Korrelationen. Anhand des Bestimmtheitsmaßes läßt sich vermuten, daß *in vivo* 78,9 % und *in vitro* 91,6 % der Bindung von der Lipophilie der Pharmaka abhängen. Somit scheint bei der Bindung der Barbiturate an das Muskelgewebe die Lipophilie eine wichtigere Rolle zu spielen als bei den übrigen untersuchten Pharmaka.

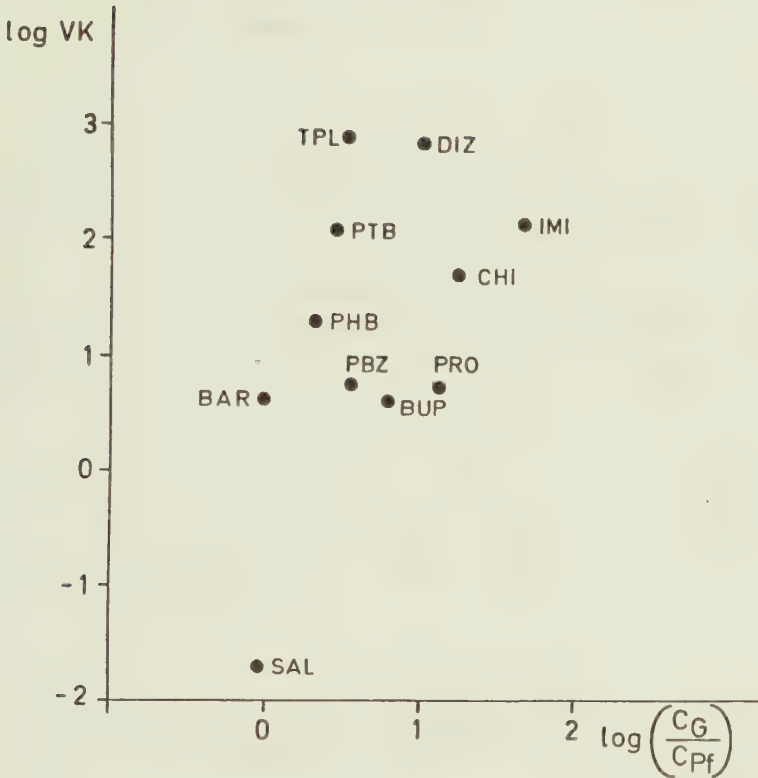


Abb. 16: Beziehung zwischen dem Verteilungskoeffizienten Oktanol/Puffer und der Bindung der Pharmaka an Muskelgewebe in vivo

Ordinate: $\log VK$ -Oktanol/Puffer pH 7 aus Tab. 1 (S. 11)

Abszisse: $\log (C_G/C_{Pf})$ = Muskelbindung in vivo; Daten aus Tab. 3 und 4 (S. 20 u.

Zwischen beiden Parametern besteht ($p > 0,05$) kein signifikanter Zusammenhang:

$r_S = 0,41$

BAR = Barbital; BUP = Buphenin; CHI = Chinidin; DIZ = Diazepam; IMI = Imipramin;
PTB = Pentobarbital; PHB = Phenobarbital; PBZ = Phenylbutazon; PRO = Propranolol;
SAL = Salicylsäure; TPL = Thiopental.

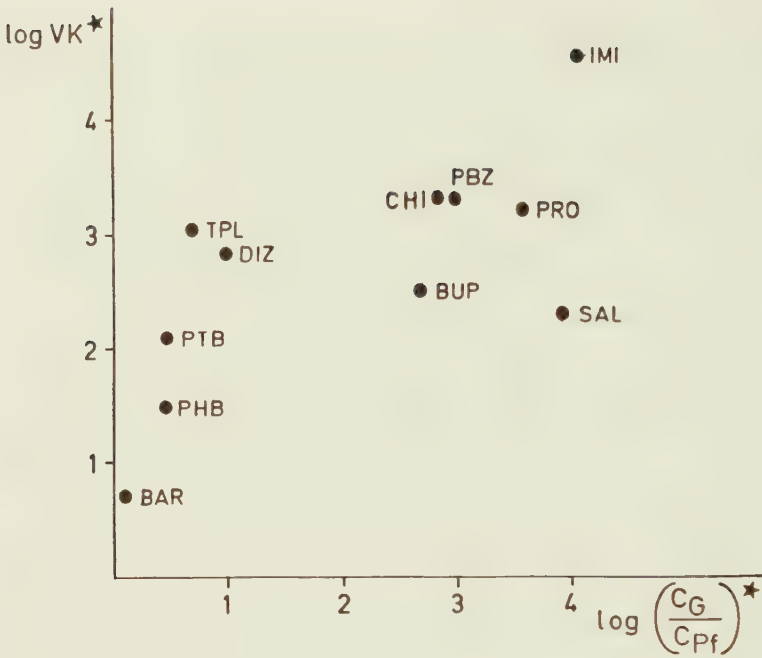


Abb. 17: Korrelation zwischen dem Verteilungskoeffizienten* Oktanol/Puffer und der Bindung an Muskelgewebe in vivo, berechnet für die nicht ionisierten Pharmaka

Zwischen beiden Parametern besteht ($p < 0,01$) ein signifikanter Zusammenhang:
 $r_s = 0,73$

Abkürzungen und weitere Erläuterungen siehe Abb. 16 bzw. Text.

IV.3. Quantitative Bedeutung der Bindung an Muskelgewebe

Weil das Muskelgewebe 40 % des Körpergewichtes ausmacht -wohingegen das Plasma mit nur etwa 4 % und die übrigen untersuchten Organe mit rund 5 % am Körpergewicht beteiligt sind-, scheint dem Muskelgewebe bei der mengenmäßigen Verteilung der Pharmaka im Organismus eine wichtige Rolle zuzukommen. Um dies zu veranschaulichen, haben wir die in Tab. 3 und 4 angegebenen Arzneistoffkonzentrationen in den einzelnen Geweben mit den entsprechenden Organgewichten* bzw. dem Plasmavolumen multipliziert. Die so erhaltenen Gesamtmengen der einzelnen Pharmaka in Leber, Niere, Lunge, Muskel und Plasma wurden miteinander verglichen.

Beim Vergleich zwischen Plasma und Muskel zeigt sich (Abb. 18), daß die im Plasma befindliche Arzneistoffmenge meist sehr gering ist im Verhältnis zur Menge in der Muskulatur. Nur bei Pharmaka mit sehr kleinem Verteilungsvolumen und hoher Plasmabindung (Salicylsäure, Phenylbutazon) sind die Mengen im Muskelgewebe und im Plasma etwa gleich groß.

Der Vergleich zwischen Leber, Lunge, Niere und Muskel zeigt, daß sich im Muskelgewebe auf Grund seines hohen Anteils am Körpergewicht noch erheblich größere Mengen an Pharmaka befinden als in den übrigen Organen. Selbst bei denjenigen Pharmaka, die in Lunge und Niere in vivo sehr hohe Konzentrationen erreichen (Chinidin, Imipramin, Propranolol) ist wegen der geringen Masse dieser Organe die darin befindliche Arzneistoffmenge gering im Verhältnis zur Menge im Muskelgewebe.

*: Für die Berechnung der Gesamtkonzentration des Arzneistoffs in den Geweben wurden folgende Organgewichte zugrunde gelegt:

	PLASMA ⁺	LEBER	LUNGE	NIERE	MUSKEL
ml/kg bzw. g/kg	40	29	5,6	3,9	400

+ : nach Armin et al. (59)

Die Organgewichte sind Durchschnittswerte, die durch Wiegen der betreffenden Organe erhalten wurden; für die Masse der Muskulatur wurden 40 % des Körpergewichtes angenommen.

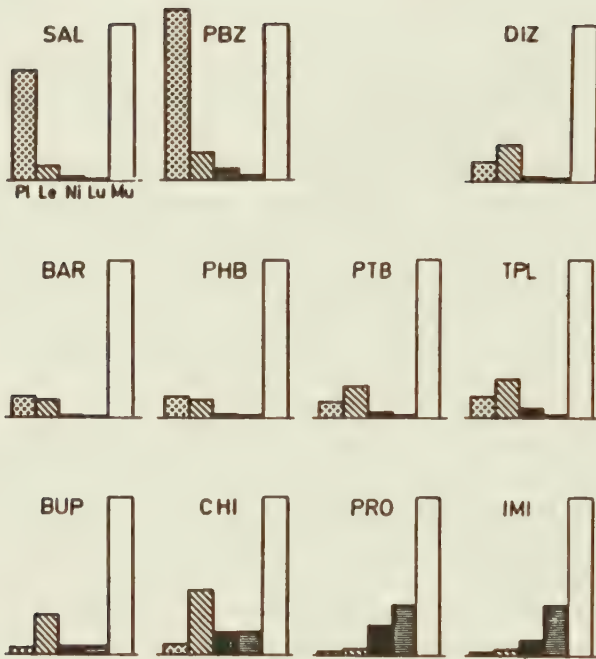


Abb. 18: Mengenmäßige Verteilung von Pharmaka in Plasma und Geweben

Die Säulen repräsentieren jeweils die Gesamtmenge der Arzneistoffe in den einzelnen Organen in der Reihenfolge Plasma (Pl), Leber (Le), Niere (Ni), Lunge (Lu) und Muskel (Mu); die Mengen sind relativ zur Menge im Muskelgewebe (= 1) angegeben.

Die Mengen in den einzelnen Organen wurden aus den Organkonzentrationen der Arzneistoffe (Tab. 3 und 4) und den entsprechenden Organgewichten berechnet (S. 69)

SAL = Salicylsäure; PBZ = Phenylbutazon; DIZ = Diazepam; BAR = Barbitol;
PHB = Phenobarbital; PTB = Pentobarbital; TPL = Thiopental; BUP = Buphenin;
CHI = Chinidin; PRO = Propranolol; IMI = Imipramin.

IV.4. Pharmakokinetische Bedeutung der Bindung an Muskelgewebe

Bekanntermaßen ist das Verteilungsvolumen eine pharmakokinetische Kenngröße für die Verteilung eines Arzneistoffs zwischen Plasma und Gewebe im Organismus. Weil bei der mengenmäßigen Verteilung eines Pharmakons im Organismus die Muskelbindung eine wichtige Rolle spielt, ist zu erwarten, daß die Muskelbindung einen starken Einfluß auf das Verteilungsvolumen hat.

Wie schon gezeigt wurde (B.II.3.), sind die in vitro gemessenen Bindungsdaten eines Pharmakons an Muskelgewebe relevant für die Verteilung des Pharmakons zwischen Plasma und Muskelgewebe in vivo. Ausgehend von diesen Überlegungen sollte man erwarten, daß auch eine Beziehung zwischen der Muskelbindung in vitro und dem Verteilungsvolumen eines Pharmakons existiert.

Sollte sich dies bewahrheiten, so wäre es möglich, das Verteilungsvolumen eines Pharmakons durch in vitro Bindungsdaten vorherzubestimmen. Dies wäre vor allem für die Erstanwendung eines Pharmakons von großer Wichtigkeit: durch das anhand von in vitro Bindungsstudien ermittelte Verteilungsvolumen ist es möglich, die richtige Dosierung des Pharmakons zu errechnen.

Der Zusammenhang zwischen dem Verteilungsvolumen und den Bindungsparametern von Plasma und Gewebe wurde durch folgende mathematischen Zusammenhänge abgeleitet:

die Gesamtkonzentration C eines Pharmakons in Plasma und Gewebe wird ausgedrückt durch

$$C_P = C_{Pf} \cdot \frac{C_P}{C_{Pf}} \quad \text{bzw.} \quad C_G = C_{Gf} \cdot \frac{C_G}{C_{Gf}} \quad , \text{ Gleichung (1)}$$

womit sich für die Gesamtmenge D des Pharmakons im Körper ergibt

$$D = V_P \cdot C_{Pf} \cdot \frac{C_P}{C_{Pf}} + V_G \cdot C_{Gf} \cdot \frac{C_G}{C_{Gf}} \quad . \quad \text{Gleichung (2)}$$

Bekanntlich ist das Verteilungsvolumen einer Substanz definiert als Quotient aus Gesamtmenge des Pharmakons im Körper und der zugehörigen Plasmakonzentration:

$$V = \frac{D}{C_P} \quad \text{Gleichung (3)}$$

Zusammen mit Gleichung (1) ergibt sich

$$V = V_P + V_G \cdot \left(\frac{C_G}{C_{Gf}} / \frac{C_P}{C_{Pf}} \right) \quad \text{Gleichung (4)}$$

Dieser Ausdruck ergibt den Zusammenhang zwischen Plasma- bzw. Gewebebindung und dem Verteilungsvolumen.

Weil sich nur die freie, im Plasma nicht gebundene Pharmakonmenge in die Gewebe verteilen kann, bezieht man das Verteilungsvolumen besser auf die freie Konzentration im Plasma, so daß analog Gleichung (3) gilt:

$$V_f = \frac{D}{C_{Pf}} \quad \text{Gleichung (5)}$$

Zusammen mit Gleichung (1) und (2) ergibt sich dann die gewünschte Beziehung:

$$V_f = V_P \cdot \frac{C_P}{C_{Pf}} + V_G \cdot \frac{C_G}{C_{Gf}} \quad \text{Gleichung (6)}$$

In Gleichung (6) ist der gewünschte mathematische Zusammenhang zwischen dem Verteilungsvolumen und der Plasma- bzw. Gewebebindung eines Pharmakons beschrieben.

Im folgenden haben wir die in vitro ermittelten Bindungsdaten der Pharmaka an Muskelgewebe und die Verteilungsvolumina miteinander verglichen. Das Verteilungsvolumen einer Substanz wird aber -wie Gleichung (6) zeigt- nicht nur von seiner Gewebefindung sondern von seiner Plasmabindung beeinflusst. Für unseren Vergleich aber wäre es sinnvoll, ein von der Plasmabindung unabhängiges "Gewebeverteilungsvolumen" zu betrachten. Dieses "Gewebeverteilungsvolumen" ist aufzufassen als das Verteilungsvolumen der freien Substanz, korrigiert um die noch im Plasma befindliche Pharmakonmenge, so daß gilt: "Gewebeverteilungsvolumen" = $V_f - V_p \cdot C_p / C_{pf}$.

Um diesen Ausdruck zu erhalten, wurden die Verteilungsvolumina V der Pharmaka (Tab. 2, S. 14) durch die freien Anteile der Pharmaka im Plasma f_p (Tab. 6, S. 32) dividiert: $V_f = V / f_p$.

Unter der Annahme, daß $V_p = 40 \text{ ml/kg}$ (59), wurde das Produkt $V_p \cdot C_p / C_{pf}$ gebildet und von V_f subtrahiert (C_p / C_{pf} wurde aus Tab. 6 entnommen).

Es wurden nun die so erhaltenen "Gewebeverteilungsvolumina" mit den in vitro Bindungsdaten der Pharmaka an Muskelgewebe verglichen. Abb. 19 zeigt, daß zwischen beiden Parametern eine enge Beziehung existiert.

Aus der Gleichung für die Regressionsgerade folgt für das Verteilungsvolumen V_f und der Muskelbindung in vitro C_G / C_{Gf} :

$$V_f - V_p \cdot \frac{C_p}{C_{pf}} = 4,25 \cdot \frac{C_G}{C_{Gf}} - 7,85$$

Aus der Gleichung geht hervor, daß schon durch die Bestimmung der Bindung von Pharmaka an Plasma (C_p / C_{pf}) und an Muskel (C_G / C_{Gf}) in vitro eine Aussage über das Verteilungsvolumen V_f der Pharmaka gemacht werden kann.

Diese Tatsache ist von Bedeutung, weil das Verteilungsvolumen neben der Geschwindigkeitskonstanten für die Elimination k_β und der Eliminationshalbwertszeit $t_{1/2}$ eine wichtige pharmakokinetische Kenngröße ist. Führt man sich den grundlegenden Zusammenhang zwischen den wichtigsten pharmakokinetischen Parametern vor Augen

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_\beta} = \frac{\ln 2 \cdot V}{Cl}$$

erscheint es bedeutsam, eine Aussage über das Verteilungsvolumen alleine schon anhand von Ergebnissen aus in vitro Bindungsstudien an Muskelgewebe machen zu können.

Bedenkt man weiterhin, daß B. Fichtl (66) zeigen konnte, daß gerade bezüglich des "Gewebeverteilungsvolumens" der freien Substanz ($V_f - V_p \cdot C_p / C_{pf}$) für viele Arzneistoffe (Barbiturate, Propranolol, Chinidin, Phenylbutazon, Diazepam) enge Korrelationen zwischen den Tierspezies (Ratte, Kaninchen, Hund) und dem Menschen bestehen, so kann man aus unseren Befunden folgern, daß schon durch die Bestimmung der Plasma- und Muskelbindung in vitro an Kaninchen eine Aussage über das Verteilungsvolumen eines Pharmakons im menschlichen Körper möglich sein müßte. Dies ist vor allem bei der Erstanwendung von Pharmaka im menschlichen Organismus von Bedeutung.

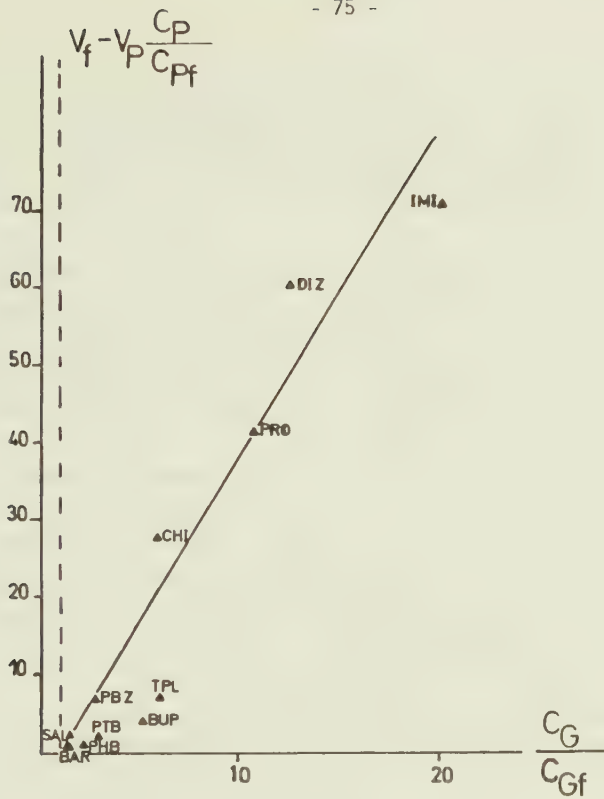


Abb. 19: Korrelation zwischen dem Verteilungsvolumen und der Muskelbindung von Pharmaka in vitro

Ordinate: "Gewebeverteilungsvolumen" der freien Substanz = Verteilungsvolumen der freien Substanz V_f , vermindert um die im Plasma befindliche Pharmakomenge $V_p \cdot C_p / C_{pf}$. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Abszisse: Bindung an Muskelgewebe in vitro = C_G / C_{Gf} ; Daten entnommen aus Tab. 6, S. 32. Da bei einer sehr schwachen Bindung an Muskelgewebe $C_G \sim C_{Gf}$, schneidet die Gerade die Abszisse nicht bei 0 sondern bei 1; die Ordinate wurde deshalb als gestrichelte Linie durch den Abszissenpunkt 1 gezeichnet.

Zwischen beiden Parametern besteht eine Korrelation: $r_s = 0,95$

BAR = Barbitol; BUP = Buphenin; CHI = Chinidin; DIZ = Diazepam; IMI = Imipramin; PBZ = Phenylbutazon; PHB = Phenobarbital; PTB = Pentobarbital; PRO = Propranolol; SAL = Salicylsäure; TPL = Thiopental.

V. Untersuchungen zur möglichen Bedeutung des Fettgewebes für
die Verteilung der Pharmaka im Organismus

In den vorangegangenen Kapiteln haben wir die Verteilung der Pharmaka in Plasma, Leber, Lunge, Niere und Muskel dargestellt; diese Gewebe repräsentieren rund 50 % des Körpergewichtes. Es ist daher von Interesse zu fragen, wieviel Prozent einer einmal verabreichten Pharmakomenge in diesen Geweben wiedergefunden werden können.

Um diese Frage zu klären, wurde von folgenden Überlegungen ausgegangen:

die nach i.v. Bolus-Injektion bzw. nach Dauerinfusion gemessenen Arzneistoffkonzentrationen in den einzelnen Geweben (C_G , siehe Tab. 3 und 4, S. 20 bzw. 23) wurden mit den jeweiligen Organgewichten (siehe S. 69) multipliziert; so wurde für jedes untersuchte Organ die darin befindliche Arzneistoffmenge ermittelt; die Arzneistoffmengen aller untersuchten Organe wurden addiert, und die Summe wurde der dem Versuchstier verabreichten Gesamtmenge gegenübergestellt; dabei wurde die Gesamtmenge an Arzneistoff, die sich 3 h nach Verabreichen des Pharmakons bzw. 5 h nach Beginn der Dauerinfusion im Körper des Versuchstieres befand, wie folgt ermittelt: Gesamtmenge Arzneistoff = $V \cdot C_p$ (V aus Tab. 2, S. 14; C_p = Plasmakonzentration des Pharmakons 3 h nach i.v. Bolus-Injektion bzw. 5 h nach Beginn der Dauerinfusion, entnommen aus Tab. 3 und 4, S. 20 bzw. S. 23).

Die in den untersuchten Geweben wiedergefundene Arzneistoffmenge errechnet sich wie folgt:

$$\% \text{-Wiederfindung} = \frac{\epsilon \text{ Organgewicht} \cdot C_G}{V \cdot C_p} \cdot 100$$

Tab. 11: Wiedergefundene Arzneistoffmenge nach Verabreichen eines Pharmakons

Die %-Wiederfindung von Phenytoin wurde aus den Angaben über die Gewebekonzentrationen von Phenytoin nach i.v. Gabe bei Kaninchen errechnet (109).

Arzneistoff	%-Wiederfindung
BARBITAL	77,1
CHINIDIN	36,9
DIAZEPAM	12,8
IMIPRAMIN	35,3
PENTOBARBITAL	65,5
PHENYLBUTAZON	45,3
PHENOBARBITAL	73,7
PHENYTOIN	45,0
PROPRANOLOL	21,9
SALICYLSÄURE	65,7
THIOPENTAL	23,5

Vergleicht man nun für alle untersuchten Pharmaka die in den Geweben wiedergefundene Arzneistoffmenge (Tab. 11), so zeigt sich, daß die Wiederfindung stark variiert und zwischen 77,1% (Barbital) und 12,8% (Diazepam) liegt. Daher stellt sich die Frage, in welchen von uns nicht untersuchten Geweben sich die restliche (auf 100 % fehlende) Arzneistoffmenge befinden könnte. Als solche kommen in der Hauptsache das Fettgewebe und die Haut in Betracht, da diese 15 % bzw. 7 % des Körpergewichtes ausmachen (110). Bei weiterer Betrachtung der Tabelle fällt auf, daß die Wiederfindung bei stark lipophilen Substanzen (Diazepam, Thiopental) kleiner ist als bei Substanzen, die weniger stark lipophil sind (Salicylsäure, Barbital).

Als Maß für die Fettlöslichkeit eines Pharmakons kann der Grad seiner Verteilung zwischen Heptan und wässriger Phase (Phosphatpuffer pH 7) betrachtet werden (111). Wir haben nun in Abb. 20 die %-Wiederfindung gegen den Verteilungskoeffizienten Heptan/Puffer aufgetragen. Die Abbildung zeigt, daß eine negative Korrelation zwischen der Lipophilie der Pharmaka und der nach Verabreichen der Pharmaka in den untersuchten Organen wiedergefundene Arzneistoffmenge besteht. Unter der Annahme, daß sich Pharmaka auch ins Fettgewebe verteilen können, bedeutet dies, daß das

Fettgewebe für die Verteilung eines Pharmakons im Organismus eine wichtige Rolle spielt; dabei hängt das Ausmaß der im Fettgewebe befindlichen Arzneistoffmenge von der Lipophilie des Pharmakons ab. Da das Fettgewebe etwa 15 % des Körpergewichtes ausmacht, kann nach Verabreichung stark lipophiler Pharmaka die im Fettgewebe befindliche Arzneistoffmenge ein erhebliches Ausmaß annehmen.

Bei einigen Versuchstieren wurde deshalb nach Dauerinfusion einer lipophilen Substanz (Imipramin) auch Fettgewebe (Unterhautfettgewebe) entnommen und die Arzneistoffkonzentration darin bestimmt (nach C.V.2.). Dabei ergaben sich folgende Befunde (aus 2 Versuchen):

	IMIPRAMIN
Konzentration im Fettgewebe ($\mu\text{g/ml}$):	19,5 / 19,8
VK-Fettgewebe/Plasma:	40,6 / 41,3

Berechnet man nun die Wiederfindung von Imipramin unter Berücksichtigung der Verteilung ins Fettgewebe, so beträgt die Wiederfindung der verabreichten Pharmakonmenge 82,6 %, im Vergleich zu einer Wiederfindung von 35,3 % ohne Berücksichtigung des Fettgewebes.

Dies macht deutlich, welche Bedeutung dem Fettgewebe als Verteilungsraum für Pharmaka möglicherweise zukommt.

Auch Igari et al. (9) fanden nach i.v. Gabe von Diazepam im Fettgewebe der Ratte eine mehr als 10-fach höhere Konzentration des Pharmakons als im Muskelgewebe.

Da, soweit bekannt, nur wenige Untersuchungen über die Bedeutung des Fettgewebes für die Pharmakokinetik der Arzneistoffe vorliegen, ist es wichtig, durch weitere Versuche die Frage zu klären, in welchem Ausmaß sich Pharmaka in vivo im Fettgewebe anreichern können, und ob es möglich ist, die Verteilung der Pharmaka ins Fettgewebe durch in vitro Bindungsstudien an Fettgewebe bzw. auch durch den Verteilungskoeffizienten Lipid/Wasser vorherzusagen.

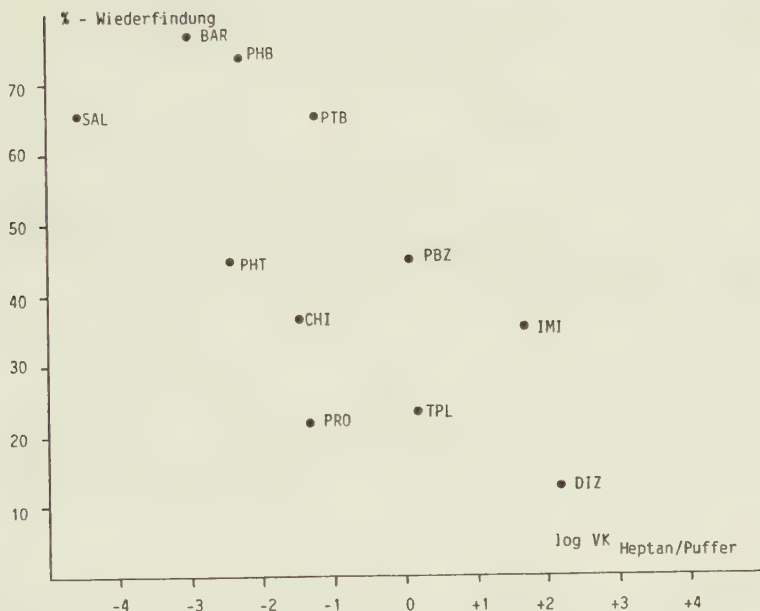


Abb. 20 : Korrelation zwischen der Lipophilie der Pharmaka und der prozentualen Wiederfindung der verabreichten Arzneistoffmenge

Abszisse: Logarithmus des Verteilungskoeffizienten Heptan/Puffer.
Die Verteilungskoeffizienten wurden zwischen Heptan und Phosphatpuffer pH 7 bestimmt (zur Methode vgl. C.III.3.); die Verteilungskoeffizienten von Diazepam, Phenylbutazon, Salicylsäure wurden der Literatur entnommen (107, 108, 101).

Ordinate: %-Wiederfindung der verabreichten Pharmakonmenge in den untersuchten Organen Plasma, Leber, Lunge, Niere und Muskel (nähere Erläuterungen siehe Text).
Die %-Wiederfindung von Phenytoin wurde aus den Angaben über die Gewebekonzentrationen von Phenytoin nach i.v. Gabe bei Kaninchen errechnet (109).

Zwischen beiden Parametern bestand eine enge Korrelation ($p < 0,01$); der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman betrug 0,73.

BAR = Barbitol; CHI = Chinidin; DIZ = Diazepam; IMI = Imipramin; PTB = Pento-barbital; PHB = Phenobarbital; PBZ = Phenylbutazon; PHT = Phenytoin; PRO = Propranolol; SAL = Salicylsäure; TPL = Thiopental.

C. Experimenteller Teil

I. Tierexperimentelle Methode

I.1. Verabreichung der Pharmaka

Tiere:

Kaninchen von verschiedener Rasse, beiderlei Geschlechts, Körpergewicht 2,5 - 3,8 kg.

Geräte und Materialien:

Infusionspumpe Braun Melsungen, Typ 1831, Melsungen; Surflo i.v. Katheter 20 G, 1 1/4 (Venenverweilkatheter), Fa. Terumo, Frankfurt; Xylestesin^R-Spray (Oberflächenanästhesie), Fa. Espe, Seefeld (Oberbay.); Infusionspritze 5,0 ml (Glas), Braun Melsungen, Melsungen.

Durchführung:

Die Verteilung der Pharmaka in vivo wurde an Kaninchen untersucht; die Versuchsdauer lag zwischen 3 und 5 Stunden. Die Tiere waren nicht narkotisiert, da eine Narkose die Verteilung der zu untersuchenden Pharmaka beeinflussen konnte. Die Schmerzfreiheit wurde dadurch erreicht, daß vor Einführen des Venenverweilkatheters die betreffende Hautstelle durch Oberflächenanästhesie schmerzunempfindlich gemacht wurde. Auf ein Heparinisieren des Blutes wurde verzichtet, da Heparin die Bindung der Pharmaka in vivo verändern kann (74). Während der Versuchsdauer wurden die Kaninchen in rechteckigen Kästen gehalten, in denen eine Öffnung für die Kaninchenohren vorhanden war.

In die Randvene des rechten und linken Kaninchenohrs wurde jeweils ein Katheter zur Blutentnahme bzw. zur Applikation des Arzneistoffes gelegt. Die intravenöse Zufuhr der Arzneistoffe geschah mit Hilfe eines Venenverweilkatheters. Bei der i.v. Bolus-

Injektion wurden 2 - 3 ml der Arzneistofflösung in 3 min verabreicht. Die Arzneistoffe wurden, sofern sie in Form ihrer Salze vorlagen (siehe Tab. 18, Anhang), in aqua ad iniectionabilia (Ph. Eur. II) gelöst. Diese Lösung wurde mit NaCl annähernd isoton gemacht. Zur Lösung und Applikation von Diazepam war eine Mischung aus 0,9 % NaCl-Lsg. - Äthanol - Propandiol im Verhältnis 1 : 1 : 2 geeignet.

Die intravenöse Dauerinfusion wurde mit Hilfe einer Infusionspumpe durchgeführt. Die Pumpgeschwindigkeit wurde vor Versuchsbeginn überprüft und betrug 2,25 ml/h. Auch bei der Dauerinfusion wurden die Arzneistoffe in Form ihrer Salze in aqua ad iniectionabilia gelöst, und die Lösung wurde mit NaCl annähernd isoton gemacht. Diazepam wurde in dem oben genannten Lösungsgemisch infundiert.

I.2. Bestimmung der Plasmakonzentration

Geräte und Materialien:

Infusionspumpe Braun Melsungen, Typ 1831, Melsungen; Infusions-spritze 50,0 ml (Glas), Braun Melsungen, Melsungen; Dauerkatheter 1 mm Ø, 15 cm lang ("Katzenkatheter"), Fa. Hauptner, München; Runne Zentrifuge C 614, Heidelberg.

Durchführung:

Zur Blutentnahme eignete sich ein Dauerkatheter, welcher von der Ohrvene bis zur oberen Hohlvene vorgeschoben wurde. Der Katheter wurde permanent mit isotoner Kochsalzlösung durchspült (Pumpgeschwindigkeit betrug 4,75 ml/h), um ein Verstopfen des Katheters durch Thrombenbildung zu vermeiden. In bestimmten Zeitabständen wurden jeweils 3 ml Blut entnommen; der erste Teil des Blutes wurde verworfen, da dieser mit der im Katheter befindlichen Kochsalzlösung verdünnt war. Das Blut wurde in Reagenzgläser gesammelt. Diese enthielten genau soviel Heparin, daß im Plasma eine Konzentration von 5 - 10 I.E. Heparin/ml Plasma entstand. Es ist

bekannt, daß Heparin die Bindung der Pharmaka in vivo verändern kann (74). Über einen Einfluß des Heparins auf die Plasmabindung in vitro liegen nur wenige Untersuchungen vor; dabei kann man davon ausgehen, daß die Veränderung der Plasmabindung bei geringer Heparinkonzentration am geringsten ist. Wir haben deshalb eine Heparinkonzentration gewählt, die gerade dazu ausreichte, das Blut ungerinnbar zu machen.

Das Blut wurde nach Entnahme 10 min bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand (=Plasma) wurde sofort abpipettiert und bei -30°C tiefgefroren aufbewahrt. Im Plasma wurde die Arzneistoffkonzentration bestimmt nach C.V.I.

I.3. Bestimmung der Gewebekonzentration

Geräte und Materialien:

Runne Zentrifuge C 614, Heidelberg; Präparierbesteck.

Durchführung:

Drei Stunden nach i.v. Bolus-Injektion bzw. 5 Stunden nach Dauerinfusion des Arzneistoffs wurden die Kaninchen durch Genickschlag und Entbluten getötet. Um die Pharmakonzentration in den Organen zu bestimmen, wurden Leber, Niere, Lunge, Skelettmuskel (musculus psoas), in manchen Fällen zusätzlich Zwerchfell, Herzmuskel roter Muskel (musculus adductor) und weißer Muskel (musculus vastus medialis) entfernt. Die Organe wurden mit isotoner Kochsalzlosung abgespült und von anhaftenden Fett oder Bindegewebe freipräpariert. Die Gallenblase wurde aus der Leber entfernt. Alle so aufgearbeiteten Organe wurden bei -30°C tiefgefroren aufbewahrt. Auch Urin und Blut wurde von den getöteten Tieren gewonnen. Aus dem Blut wurde wie unter C.1.2. beschrieben Plasma hergestellt; Plasma und Urin wurden bei -30°C tiefgefroren.

II. Verteilung der Pharmaka in vivo

II.1. Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter

Zur Berechnung der Arzneistoffdosierung bei den in vivo Experimenten war es erforderlich, die pharmakokinetischen Parameter der Arzneistoffe zu kennen. Waren in der Literatur keine oder nur sehr divergierende Angaben (Propranolol) vorhanden, wurden die pharmakokinetischen Parameter (Halbwertszeit $t_{1/2}$, Verteilungsvolumen V , Clearance Cl) folgendermaßen ermittelt:

die Arzneistoffe wurden durch eine i.v. Bolus-Injektion verabreicht; dabei wurde folgende Dosierung gewählt (Tab. 12).

<u>ARZNEISTOFF</u>	<u>Dosierung: mg/kg Körpergewicht</u>
Buphenin	10
Diazepam	4
Phenylbutazon	5
Propranolol	5
Salicylsäure	20
Thiopental	20

Tab. 12: Arzneistoffdosierung zur Ermittlung der pharmakokinetischen Parameter nach i.v. Bolus-Injektion

Bis zu 4 Stunden nach der i.v. Bolus-Injektion wurde in bestimmten Zeitabständen Blut entnommen (vgl. C.I.2.) und die Arzneistoffkonzentration im Plasma bestimmt (nach C.V.1.). Der zeitliche Verlauf der Plasmakonzentration folgte entweder einer Ein- oder Zweikompartimentkinetik. Für den zeitlichen Verlauf der Plasmakonzentration der Arzneistoffe gilt, vorausgesetzt die Elimination folgt (üblicherweise) einer Kinetik 1. Ordnung, folgende Beziehung:

$$C(t) = C_a \cdot e^{-k_\beta t} \quad \text{für die Einkompartimentkinetik}$$

und

$$C(t) = C_a \cdot e^{-k_\alpha t} + C_b \cdot e^{-k_\beta t} \quad \text{für die Zweikompartimentkinetik}$$

$C(t)$: Arzneistoffkonzentration zur Zeit t ($\mu\text{g/ml}$)

C_a, C_b : Arzneistoffkonzentration zu Beginn der α - bzw. β -Phase

t : Zeit (min)

k_α, k_β : Geschwindigkeitskonstante der α - bzw. β -Phase (min^{-1})

Die oben genannten Beziehungen für das Ein- oder Zweikompartimentmodell wurden durch nichtlineare Regression (nach Pfeffer, 75) den Meßpunkten (= Plasmakonzentration zur Zeit t) angeglichen, und der zeitliche Verlauf der Plasmakonzentration wurde durch eine Kurve beschrieben (vgl. Abb. 3, S. 12). Aus dem Kurvenverlauf wurden die pharmakokinetischen Parameter nach Rowland und Tozer (76) wie folgt berechnet:

Geschwindigkeitskonstante k (min^{-1}): aus den oben genannten Beziehungen

$$\text{Verteilungsvolumen } V \text{ (l/kg): } V = \frac{\text{Dosis}}{\text{Fläche} \cdot k_\beta}$$

(Fläche = Fläche unter dem Kurvenverlauf der Plasmakonzentration)

$$\text{Clearance } Cl \text{ (ml/min/kg)} : Cl = V \cdot k_\beta$$

$$\text{Halbwertszeit } t_{1/2} \text{ (min)} : t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_\beta}$$

11.2. Verteilung nach i.v. Bolus-Injektion und nach Dauerinfusion

Um die Verteilung der Arzneistoffe zwischen Plasma und Gewebe zu bestimmen, wurden zwei Arten von Experimenten durchgeführt:

zum einen wurden die Arzneistoffe als i.v. Bolus-Injektion verabreicht; dabei wurden folgende Konzentrationen (in mg/kg Körpergewicht) gewählt:

Barbital 20, Buphenin 10, Chinidin 10, Imipramin 20, Pento-
barbital 50, Phenobarbital 20, Phenylbutazon 10, Proprano-
lol 5, Salicylsäure 20, Thiopental 20.

3 Stunden nach Injektion wurden die Tiere getötet und die Pharmakonkonzentration in Plasma, Leber, Lunge, Niere und Skelettmuskel (musculus psoas) gemessen.

Bei einigen Experimenten wurde die Verteilung der Arzneistoffe nach Dauerinfusion des Pharmakons gemessen. Das Ziel war, einen konstanten "Blutspiegel" (Gleichgewichtskonzentration C_{ss}) über 5 Stunden aufrechtzuerhalten (die Gleichgewichtskonzentrationen der einzelnen Pharmaka wurden so gewählt, daß sie im therapeutischen Konzentrationsbereich beim Menschen lagen). Die zur Erzielung und Aufrechterhaltung der gewünschten Gleichgewichtskonzentration (steady-state Konzentration) notwendige Dauerinfusion ergab sich aus:

$$\frac{D}{t} = Cl \cdot C_{ss}$$

D : zugeführte Arzneistoffmenge (mg/kg)

t : Zeiteinheit (min)

Cl : Clearance (ml/min/kg)

C_{ss} : gewünschter Plasmaspiegel ($\mu\text{g/ml}$)

Da bis zum Erreichen des Gleichgewichtes 4 - 5 Halbwertszeiten vergehen, wurde, um den Tierversuch nicht unnötig zu verlängern, zu Beginn des Versuchs eine "loading dose" (Initialdosis) verabreicht. Diese berechnet sich wie folgt: $D = C_{ss} \cdot V$
(V = Verteilungsvolumen in l/kg)

Die Initialdosis wurde in 3 min verabreicht. Vorversuche zeigten, daß die Kaninchen gegenüber Imipramin sehr empfindlich reagieren und bei zu rascher Injektion sterben. Deshalb wurde die Initialdosis von Imipramin kontinuierlich über 20 min verteilt zugeführt.

Während der Versuchsdauer wurde alle 30 min Blut entnommen, um zu überprüfen, ob die Arzneistoffkonzentration im Laufe der Zeit konstant blieb. Nach 5 Stunden wurde das Versuchstier getötet. Die Arzneistoffkonzentration in Plasma und Gewebe wurde bestimmt. Dabei wurde zusätzlich zu den oben genannten Organen Muskelgewebe von verschiedenen Körperstellen entnommen: Zwerchfell, Herzmuskel, roter Muskel (musculus adductor) und weißer Muskel (musculus vastus medialis). Außerdem wurde bei jedem Versuchstier der freie Anteil des Pharmakons im Plasma durch Dialyse gemessen (C.3.1.).

III. Verteilung der Pharmaka in vitro

III.1. Bindung der Pharmaka an Plasma: Dialyse

Eine geeignete Methode, um den freien bzw. gebundenen Anteil der Arzneistoffe im Plasma zu bestimmen, ist die Gleichgewichtsdialyse (77).

Geräte und Materialien:

Dianorm^R -Dialysiergerät mit V A-Stahl-Dialysezellen, die dem Typ GD 2 originalgetreu nachgebaut waren, Fa. Diachema, Langnau/Zürich, Schweiz; Dialysemembran Diachema (Durchmesser 63 mm; Membrandicke 0,025 mm; MG cut off 5000 D), Fa. Diachema, Langnau/Zürich, Schweiz; 0,125 Mol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Puffer pH 7,4, siehe Tabellenanhang.

Versuchsbedingungen:

Das bei den in vitro Bindungsstudien verwendete Plasma wurde aus Kaninchenblut gewonnen; dieses wurde mit Heparin ungerinnbar gemacht (über den Einfluß von Heparin auf die Plasmabindung siehe C.1.2.), 10 min bei 2000 g zentrifugiert und der Überstand (=Plasma) bei - 30 °C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Um den freien Anteil der Arzneistoffe im Plasma zu bestimmen, wurden in Vorversuchen -Kaninchenplasma wurde mit entsprechenden Arzneistoff- bzw. Heparinmengen versetzt- der Einfluß folgender Parameter getestet oder anhand von Literaturangaben ausfindig gemacht: Dialysedauer, Arzneistoffkonzentration, Heparinkonzentration, Einfrieren der Plasmaproben.

Folgende Versuchsbedingungen erwiesen sich als geeignet:

1. Aus Dialyseversuchen mit Imipramin, Diazepam (eigene Versuche) und Chinidin (Guentert et al., (17)) ging hervor, daß sich bei 37° C nach 5 - 6 h ein Dialysegleichgewicht zwischen gebundenem und freien Anteil eingestellt hat. Abb.21 soll dies veranschaulichen. Da alle anderen untersuchten Arzneistoffe ein ähnliches Molekulargewicht hatten und deshalb keine Störung in der Diffusion z.B. durch Aggregatbildung zu erwarten war, wurde die Dialysedauer bei allen Arzneistoffen auf 6 Stunden festgelegt.

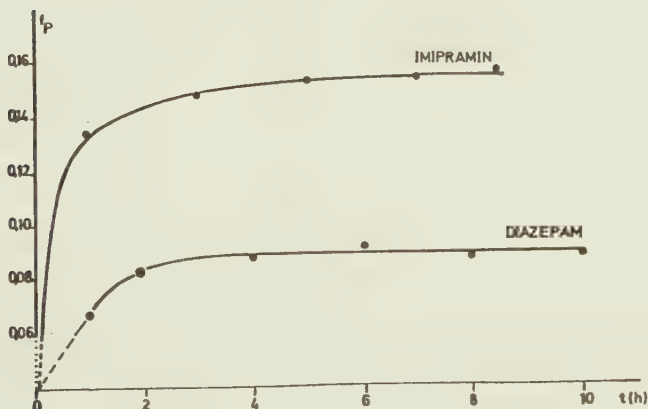


Abb.21 : Dialyse von Diazepam (1 µg/ml vor Dialyse) und Imipramin (500 ng/ml v.D.) gegen Phosphatpuffer pH 7,4 bei 37° C. Angegeben ist der freie Anteil von Diazepam und Imipramin in Abhängigkeit von der Dialysedauer.

2. Die Bindung der Arzneistoffe an Plasmaproteine wurde bei einer Konzentration von 10^{-5} Mol/l gemessen. Diese Konzentration liegt für die meisten untersuchten Pharmaka im therapeutischen Bereich und entspricht bei einem mittleren Molekulargewicht von 300 einer Konzentration von 3 µg/ml. Bei Chinidin, Diazepam, Imipramin und Thiopental wurde auch das von den Versuchstieren gewonnene Plasma dialysiert; hier lagen die Konzentrationen wie folgt: Chinidin 2,1 µg/ml; Diazepam 1,0 µg/ml; Imipramin 0,48 µg/ml; Thiopental 9,5 µg/ml - vgl. Tab. 4., S. 23.

3. Da Heparin in höherer Konzentration auch in vitro die Plasma-bindung bestimmter Pharmaka verändern kann (78), wurde darauf geachtet, daß das Plasma nicht mehr als 5 - 10 I.E. Heparin pro ml Plasma enthielt. Bei vier Arzneistoffen wurde der Einfluß von Heparin auf die Plasmabindung getestet (Tab. 13). Übereinstimmend mit Guentert et al. (17) stellten wir fest, daß eine steigende Konzentration von Heparin die Plasmabindung von Chinidin vermindert.

	CHINIDIN	DIAZEPAM	IMIPRAMIN	THIOPENTAL
5 I.E./ml	8,9%	8,4%	17,2%	15,0%
10 I.E./ml	9,5%	8,1%	17,9%	13,8%
20 I.E./ml	12,3%	8,4%	17,8%	13,9%
40 I.E./ml	14,9%	8,5%	17,7%	13,2%

Tab. 13: Einfluß der Heparinkonzentration (I.E./ml) auf den freien Anteil (in %) der Pharmaka im Plasma

Die Dialyse wurde 6 Stunden bei 37° C durchgeführt. Die Arzneistoffkonzentration vor Dialyse betrug bei Chinidin 2,0 µg/ml, bei Diazepam 1,0 µg/ml, bei Imipramin 0,5 µg/ml und bei Thiopental 20,0 µg/ml.

4. Nach Berichten von Kristensen (79) und Guentert (17) führt ein Einfrieren der Plasmaproben auf -30°C nicht zu einer Veränderung der Plasmabindung von Imipramin bzw. Chinidin. Da Baur et al. (80) für 10 weitere Pharmaka (unter anderem Thiopental) keine Veränderung der Plasmabindung durch Einfrieren feststellen konnten, wurden alle Plasmaproben bei -30°C tiefgefroren bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Dies war in der Regel nicht länger als 4 Wochen.

Durchführung der Dialyse:

Die Dialysemembranen wurden 3 mal 30 min mit aqua demineralisata gewässert und anschließend im Dialysepuffer ($0,125\text{ Mol/l Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer pH 7,4) equilibriert. Die Membranen wurden zwischen Filterpapier von anhaftenden Puffer befreit und im noch feuchten Zustand zwischen die Zellen gelegt. Die Zellen wurden zusammengebaut, und die einzelnen Hälften (= Dialysekammer) mit einer verstellbaren 5 ml Abimed^R-Pipette gefüllt.

Sowohl bei den in vitro Bindungsstudien als auch bei der Bestimmung des freien Arzneistoffanteils im Plasma der Versuchstiere wurden jeweils 2,0 ml Plasma gegen 2,0 ml Dialysepuffer im Wasserbad bei 37°C 6 Stunden lang dialysiert.

Die Zellen rotierten dabei mit einer Drehzahl von 10 Umdrehungen pro Minute.

Nach 6 Stunden wurden die Zellen entleert, und die Arzneistoffkonzentration in beiden Kammern wurde bestimmt.

Bei jeder Bindungsstudie wurde auch eine Lösung des Arzneistoffs in Puffer (= proteinfreie Lösung) bekannter Konzentration mitdialysiert. Dadurch konnte eine eventuelle Bindung der Arzneistoffe an die Membran bzw. an die Oberfläche der Stahlzellen erfaßt werden. Diese "Adsorption" lag beispielsweise für Imipramin bei durchschnittlich 10,5 %, für Diazepam bei 8,8 % und für Chinidin bei 12,0 %. Dieser "Adsorptionsfehler" an Membran und Oberfläche der Zellen spielt bei der Berechnung des freien Anteils allerdings keine Rolle, da die Arzneistoffkonzentration auf beiden Seiten der Membran gemessen wurde.

Bei der Bestimmung des freien Arzneistoffanteils im Plasma der Versuchstiere wurde im Falle von Thiopental und Chinidin das nach Töten der Versuchstiere gewonnene Plasma wie oben beschrieben dialysiert, und die Arzneistoffkonzentration auf beiden Seiten der Membran wurde nach einem geeigneten Extraktionsverfahren (nach C.V.1.) gemessen. Im Falle von Imipramin und Diazepam wurde zum Plasma des Versuchstieres noch radioaktiv markierte Substanz gegeben, und nach Dialyse wurde in 200 µl der Plasma- bzw. Pufferproben die Arzneistoffkonzentration durch Flüssigszintillationsmessung ermittelt (siehe C.V.3.b.).

Bei der Bestimmung der Plasmabindung der Arzneistoffe *in vitro* wurden dem Plasma kleine Volumina wässriger Arzneistofflösungen zugegeben, so daß die Endkonzentration der Arzneistoffe im Plasma bei 10^{-5} Mol/l lag. Bei Diazepam, Imipramin, Pentobarbital, Phenobarbital, Propranolol und Salicylsäure geschah die Messung der Arzneistoffkonzentration durch Flüssigszintillationsmessung der radioaktiv markierten Spezies (C.V.3.b.); bei den anderen untersuchten Pharmaka wurde die Konzentration nach einem geeigneten Extraktionsverfahren bestimmt (C.V.1.).

Berechnung des freien Anteils der Pharmaka im Plasma: f_p

Bei der Berechnung wurde vorausgesetzt, daß sich bei Verwendung von radioaktiv markierten Arzneistoffen die markierten Substanzen bezüglich der Bindungseigenschaften genauso verhalten wie die Originalsubstanzen.

Der nicht gebundene Pharmakonanteil f_p nach Dialyse berechnet sich wie folgt:

$$f_p = \frac{C_{pf}}{C_p}$$

C_{pf} : freie Arzneistoffkonzentration auf der Pufferseite der Membran (µg/ml)

C_p : gebundene und freie Arzneistoffkonzentration auf der Plasmaseite der Membran (µg/ml)

f_p : freier Anteil des Pharmakons nach Dialyse

Ein anderer Ausdruck für die Bindung an Plasmaproteine ist der Quotient aus Gesamtkonzentration C_p und freier Konzentration C_{pf} des Pharmakons im Plasma; diesen Ausdruck erhält man aus:

$$\frac{1}{f_p} = \frac{C_p}{C_{pf}}$$

III.2. Bindung der Pharmaka an Gewebe: Ultrafiltration

Geräte und Materialien:

Fleischwolf; Homogenisator "Tornado", Fa. Emmendingen Maschinenbau, Emmendingen;

Visking Dialyserschlauch 20/32, Wandstärke 0,02 mm, Porendurchmesser durchschnittlich 15 - 20 Å, Ausschlußgrenze 10 000 D, Fa. Serva, Feinbiochemica, Heidelberg;

Proteinelektrode-Einstabmeßkette mit Spezialdiaphragma 405-88, Fa. Ingold, Frankfurt;

Digital pH-Meter Nr. 646, Fa. Knick, München;

Zentrifuge Nr. 213 701, Fa. W. Stock Maschinenbau, Marburg;

0,125 Mol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer pH 7,0, siehe Tabellenanhang; Präparierbesteck;

Digitalwaage Typ 1205, Fa. Sartorius, Göttingen.

Herstellung der Gewebehomogenate:

Kaninchen wurden nach Genickschlag aus der Arteria carotis entblutet. Leber, Lunge und Niere wurden entnommen, mit 0,9 % NaCl-Lösung abgespült, von anhaftendem Bindegewebe und Fett freipräpariert und bei -30 °C tiefgefroren. Außerdem wurde die faszienarme und daher zum Homogenisieren geeignete Muskulatur des musculus psoas entfernt, wie eben beschrieben behandelt und tiefgefroren aufbewahrt.

Zur Herstellung der Homogenate wurden die Gewebe über Nacht im Kühlraum ($4 - 5^{\circ}\text{C}$) aufgetaut und anschließend im Fleischwolf zerkleinert. 25,0 g des zerkleinerten Gewebes wurden mit Phosphatpuffer pH 7,0 vermischt, so daß das Verhältnis Puffer:Gewebe 0,8:1 betrug. Dann wurde mit dem Homogenisator bei 10 000 Umdrehungen/min 3 min homogenisiert. Diese Arbeiten erfolgten im Eisbad oder im Kühlraum bei 4°C .

Da der intrazelluläre pH-Wert in vivo bei 7,0 liegt (91), sollten auch die Bindungsstudien bei pH 7,0 erfolgen. Allerdings reichte die Kapazität des Puffers zunächst nicht aus, um den pH-Wert auf 7,0 zu halten, weil sich durch die postmortal ablaufende Glykolyse saure Stoffwechselprodukte im Gewebe (vor allem Muskelgewebe) anreichern. Durch Zugabe von 2 Mol/l Na_2CO_3 -Lösung wurde der pH-Wert der Homogenate auf 7,0 eingestellt. Für das Muskelgewebe waren durchschnittlich 1,5 ml 2 Mol/l Na_2CO_3 -Lösung pro 100 g Homogenat erforderlich, für die Homogenate der anderen Organe waren es 0 - 0,9 ml/100 g.

Der Wassergehalt der Homogenate wurde bestimmt, indem Homogenatproben bei 105°C zur Gewichtskonstanz getrocknet wurden.

Durchführung der Ultrafiltration:

Die zu untersuchenden Pharmaka wurden in kleinen Volumina wässriger Lösung zu den Gewebekomogenaten gegeben, so daß die Endkonzentration des Gewebes im Homogenat 50 g pro 100 g Homogenat war. Von diesem Homogenat wurden 10,0 g in Dialyseschläuche gefüllt. Diese Schläuche waren 15 cm lang und wurden vor Gebrauch 3 mal 30 min gewässert und mit Phosphatpuffer pH 7,0 equilibriert. Die an beiden Enden verknoteten, mit Homogenat gefüllten Dialyseschläuche wurden in Zentrifugengläser gegeben, die einen Siebeinsatz enthielten. Die Ultrafiltration wurde bei 4°C 5 h lang in einer Zentrifuge bei 270 g durchgeführt, bis 1 ml Ultrafiltrat erhalten wurden. Ebenso wurden Homogenat ohne Pharmakon (Blindwert) und Phosphatpuffer pH 7,0 mit Pharmakon ultrafiltriert, wobei die Pharmakonkonzentration im Puffer im Bereich der Pharmakonkonzentration im Ultrafiltrat der Gewebekomogenate lag. Letzt-

genannter Versuch diente sowohl zur Berechnung des freien Anteils (siehe unten), als auch zur Erfassung einer eventuellen Adsorption der Pharmaka an die Membran. Die Adsorption lag durchschnittlich bei 5 - 10 %.

Die gewählte Arzneistoffkonzentration lag bei 10 $\mu\text{Mol/l}$. Die freie Konzentration des Arzneistoffs im Ultrafiltrat wurde bei Verwendung von radioaktiv markierten Substanzen (Diazepam, Imipramin, Pentobarbital, Phenobarbital, Propranolol, Salicylsäure) direkt durch Flüssigszintillationsmessung bestimmt (C.V.3.b.); andernfalls wurde die freie Arzneistoffkonzentration nach Extraktion des Arzneistoffs aus dem Ultrafiltrat wie unter C.V.1. beschrieben ermittelt.

Berechnung des freien Anteils der Pharmaka im Gewebe: f_G

Gemessen wurden die freie Konzentration des Pharmakons im Ultrafiltrat des Gewebehomogenates = C_{HO} und die Konzentration des Pharmakons im Ultrafiltrat des Pufferansatzes = C_{PU} , jeweils in $\mu\text{g/ml}$.

Der freie Anteil des Pharmakons im Gewebehomogenat ergibt sich aus:

$$f_G = \frac{C_{HO} \cdot w}{C_{PU} \cdot v}$$

w: Wassergehalt des Homogenates (ml/g)

v: Verdünnungsfaktor des Pharmakons im Pufferansatz gegenüber dem Homogenat (ml/g)

Der so ermittelte freie Pharmakonanteil wurde bei verdünnten Homogenaten (50 %) gemessen. Wie frühere Untersuchungen aus unserem Arbeitskreis zeigen, kann die Bindung von Pharmaka an verdünnte Homogenate in den meisten Fällen auf unverdünnte Homogenate extrapoliert werden (8).

Es gilt dann:

$$f_G (\text{unverdünnt}) = f_G (\text{verdünnt}) \cdot 1/B,$$

wobei B den Verdünnungsgrad des Homogenates ausdrückt.

Ein anderer Ausdruck für die Bindung der Pharmaka an Gewebe ist der Quotient Ges.Konz./freie Konz. des Pharmakons im Gewebehomogenat; diesen Ausdruck erhält man aus:

$$\frac{1}{f_G} = \frac{C_G}{C_{Gf}}$$

III.3. Bestimmung der Verteilungskoeffizienten Lipid/Wasser

Geräte und Materialien:

Reagenzgläser (20 cm lang; 2,7 cm Durchmesser); Schüttler; Runne Zentrifuge C 614, Heidelberg; 0,125 Mol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Puffer pH 7, siehe Tabellenanhang; Oktanol und Heptan (technischer Reinheitsgrad).

Durchführung:

Für alle untersuchten Pharmaka wurde der Verteilungskoeffizient zwischen Oktanol bzw. Heptan und Puffer bestimmt. Als wässrige Phase wurde 0,125 Mol/l Phosphatpuffer pH 7,0 verwendet. Der pH-Wert wurde vor und nach dem Schütteln mit der Lipidphase kontrolliert. Vor Gebrauch wurde die Pufferlösung mit Oktanol bzw. Heptan und das Oktanol bzw. Heptan mit Pufferlösung abgesättigt.

Zur Bestimmung der Verteilungskoeffizienten Lipid/Wasser wurden die Substanzen im Puffer zu einer Konzentration von 10^{-5} Mol/l gelöst und eine Stunde lang zusammen mit der Oktanolphase bei Raumtemperatur geschüttelt; danach war ein Gleichgewicht vorhanden. Sodann wurden die beiden Phasen durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 1000 g getrennt. Die Konzentration der Pharmaka wurde in der wässrigen Phase vor und nach Eintritt des Verteilungsgleichgewichtes gemessen; bei Diazepam, Imipramin, Pentobarbital, Phenobarbital, Propranolol und Salicylsäure geschah dies durch Flüssigszintillationsmessung der radioaktiv markierten Spezies (C.V.3.b.), bei allen anderen Pharmaka nach einem geeigneten Extraktionsverfahren (C.V.1.).

Der Verteilungskoeffizient Lipid/Wasser berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{VK-Lipid/Wasser} = \frac{V_W \cdot (C_1 - C_2)}{V_L \cdot C_2}$$

V_W bzw. V_L : Volumen der Wasser-bzw. Lipidphase (ml)

C_1 : Konzentration des Pharmakons in der Wasserphase vor der Verteilung ($\mu\text{g/ml}$)

C_2 : Konzentration des Pharmakons in der Wasserphase nach der Verteilung ($\mu\text{g/ml}$)

IV. Rechnerischer Vergleich der in vivo und in vitro ermittelten Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma

Bei der Untersuchung der Verteilung der Pharmaka in vivo wurden jeweils die Gesamtkonzentrationen der Arzneistoffe im Gewebe (C_G) und im Plasma (C_P) bestimmt. Als Maß für die Verteilung eines Pharmakons in vivo dient der Verteilungskoeffizient Gewebe/Plasma = Quotient Ges.Konz.Gewebe/Ges.Konz.Plasma = C_G/C_P . Um die Ergebnisse aus den in vivo Experimenten mit den Ergebnissen aus den in vitro Bindungsstudien vergleichen zu können -hier wurden jeweils die freien Anteile der Pharmaka in Plasma und Gewebe, f_P bzw. f_G bestimmt-, wurden folgende Annahmen gemacht:

1. Die Beziehung zwischen Gesamtkonzentration und freier Konzentration des Pharmakons in Plasma und Gewebe ist gegeben durch:

$$C_{Pf} = C_P \cdot f_P \quad (\text{Gleichung 1})$$

und

$$C_{Gf} = C_G \cdot f_G \quad (\text{Gleichung 2})$$

2. Sobald sich ein Verteilungsgleichgewicht eingestellt hat, ist die freie Konzentration des Pharmakons in Plasmawasser und Gewebewasser gleich groß:

$$C_{Pf} = C_{Gf} \quad (\text{Gleichung 3})$$

Aus Gleichung 1 - 3 ergibt sich dann für den aus in vitro Bindungsstudien berechneten Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma:

$$C_G/C_P = f_P/f_G,$$

wobei f_P und f_G durch Dialyse bzw. durch Ultrafiltration bestimmt wurden (f_G wurde für unverdünntes Homogenat berechnet, C.III.b.)

Es wurde geprüft, ob die Verteilung der Arzneistoffe in vivo vorhergesagt werden kann, in dem die -wie oben gezeigt- aus in vitro Bindungsdaten berechneten Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma mit den in vivo gemessenen verglichen wurden.

V. Quantitative Bestimmung der untersuchten Pharmaka

V.1. Bestimmung der Arzneistoffkonzentration im Plasma und in wässriger Lösung

Geräte und Materialien:

Rotavapor, Fa. Büchi, Schweiz; Wasserstrahlpumpe; Schüttler; Reagenzgläser; Runne Zentrifuge, Heidelberg; Mikropipette "Microman" M 250, Fa. Abimed, Düsseldorf; Diäthyläther (wasserfrei), Hexan, pro analysi, Fa. Merck, Darmstadt; Chloroform, Petroläther, Heptan (technischer Reinheitsgrad); sonstige Chemikalien Fa. Merck; Methanol für die Fluoreszenzspektroskopie, Fa. Merck.

Durchführung:

Analytik der in vitro Untersuchungen

Im Plasma und in der Pufferlösung nach Dialyse sowie im Ultrafiltrat der Gewebehomogenate konnte die Arzneistofflösung bei Verwendung von radioaktiv markierten Substanzen unter Umgehung eines Extraktionsprozesses direkt durch Flüssigszintillationsmessung bestimmt werden (C.V.3.b.); dies war der Fall bei Diazepam, Imipramin, Phenobarbital, Pentobarbital, Propranolol und Salicylsäure.

Für die Arzneistoffe Barbital, Buphenin, Chinidin, Phenylbutazon und Thiopental wurde ein in Tab. 14 beschriebenes Extraktionsverfahren durchgeführt.

Analytik der in vivo Untersuchungen

Bei der Durchführung der in vivo Untersuchungen wurde kein radioaktiv markierter Arzneistoff verwendet. Da die Pharmaka in vivo enzymatisch rasch verändert werden können, wurde darauf geachtet, daß das verwendete Verfahren den Arzneistoff qualitativ und quantitativ bestimmen kann; eine dafür geeignete Methode war die Hochdruckflüssigkeitschromatographie. Darüber hinaus wurden die Pharmaka nach geeigneten Extraktionsmethoden auch durch optische

ARZNEISSTOFF	EXTRAKTIONSMITTEL	MESSVERFAHREN	NACHWEISGRENZE (Mol/l)	LITERATUR
BARBITAL	Chloroform	spektrophotometrisch	$2 \cdot 10^{-4}$	Goldbaum (82)
BUPHENIN	Diäthyläther	spektrophotometrisch	$3 \cdot 10^{-5}$	Weikel et al. (83)
CHINIDIN		HPLC	$6 \cdot 10^{-8}$	Guentert et al. (12)
DIAZEPAM	Diäthyläther	HPLC	$7 \cdot 10^{-8}$	Brodie et al. (84)
IMIPRAMIN	Hexan (0,5 % Di- äthylamin)	HPLC	$7 \cdot 10^{-8}$	Johnson et al. (85)
PENTOBARBITAL	Petroläther (1,5 % Amylalkohol)	spektrophotometrisch	$4 \cdot 10^{-5}$	Brodie et al. (86)
PHENOBARBITAL	Chloroform	spektrophotometrisch	$2 \cdot 10^{-4}$	Goldbaum (82)
PHENYLBUTAZON	Heptan	spektrophotometrisch	$9 \cdot 10^{-5}$	Jähnchen, Levy (87)
PROPRANOLOL	Heptan	spektrofluorimetrisch	$2 \cdot 10^{-7}$	Shand et al. (88)
SALICYLSAURE	Chloroform	spektrofluorimetrisch	$7 \cdot 10^{-5}$	Rowland, Riegelmann (89)
THIOPENTAL	Hexan	HPLC	$1 \cdot 10^{-7}$	Brodie et al. (90)

Tab. 14 : Übersicht über die Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Pharmaka in Plasma und wässriger Lösung
In Klammer wurde das betreffende Zitat angegeben.

Methoden (spektrophotometrisch, spektrofluorimetrisch) bestimmt. Eine Übersicht über die verwendeten Analysenverfahren enthält Tab. 14.

Ehe das in der Literatur beschriebene Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Pharmaka (Tab. 14) übernommen wurde, ist in Vorversuchen die Extraktionsausbeute der Pharmaka aus dem Plasma überprüft worden.

Vorversuch zur Bestimmung der Wiederfindungsrate

Eine wässrige Arzneistofflösung bekannter Konzentration wurde dem Plasma zugesetzt und der Arzneistoff wurde nach dem jeweils beschriebenen Verfahren extrahiert; es wurden mindestens 3 verschiedene Konzentrationen gewählt, die im oberen, mittleren und unteren Bereich der zu erwartenden Arzneistoffkonzentration in vivo lagen; die Wiederfindungsrate des eingesetzten Pharmakons betrug für alle untersuchten Substanzen mindestens 90 %, verglichen mit einer ebenso behandelten wässrigen Lösung gleicher Arzneistoffkonzentration. Die nachfolgende Tabelle zeigt ein Beispiel:

<u>Chinidinkonzentration im Plasma (ng/ml):</u>	<u>Fläche:</u>	<u>%-Wiederfindung:</u>
100	10846	100,3
200	20408	94,4
400	38960	90,1
1000	98760	91,3
2000	194630	90,0
3000	300470	92,6
		Mittelwert = 93,1 %
<u>Blindwert (ng/ml):</u> (wässrige Lsg. mit Chinidin)	<u>Fläche:</u>	
100	11649	
400	42804	
1000	100905	
		Mittelwert = 108135 berechnet für 1000 ng/ml
<u>Leerwert</u> (Plasma ohne Pharmakon): nicht meßbar		

Tab.15 : Vorversuch zur Extraktion von Chinidin aus Kaninchenplasma

Kaninchenplasma wurde derart mit Chinidin versetzt, daß eine Konzentrationsreihe von 0 - 3000 ng/ml entstand; das Plasma wurde wie nachfolgend beschrieben mit HPLC analysiert, und die Konzentration von Chinidin wurde fluorimetrisch bestimmt (die Meßsignale wurden über eine Peakflächenbestimmung ausgewertet).

Die durchschnittliche Wiederfindung betrug 93,1 %, verglichen mit einer ebenso behandelten wässrigen Lösung (Blindwert); der Standardfehler S.E. betrug 2,49, der relative Variationskoeffizient V_{rel} betrug 1,71 %.

Vorversuch zur Bestimmung der Propranololkonzentration im Plasma

Um sicher zu gehen, daß bei der Extraktion von Propranolol aus dem Plasma der Versuchstiere keine in vivo eventuell gebildeten Metaboliten erfasst werden, wurde folgender Vorversuch durchgeführt:

Kaninchenplasma wurde mit Propranolol bzw. mit dessen Metaboliten 4-Hydroxypropranolol und Naphthoxylactic-acid versetzt, so daß die Pharmaka in einer Konzentration vorlagen, die den Verhältnissen in vivo in etwa entsprach. Ebenso wurde eine wässrige Lösung der Arzneistoffe hergestellt. Plasma und wässrige Lösung wurden nach der Methode von Shand et al. (88) mit Heptan extrahiert und die Pharmaka wurden fluorimetrisch gemessen (vgl. C.V.3.c.B.). Folgende Meßwerte wurden ermittelt:

Konzentration im Plasma (ng/ml)		%-Transmission (nach Extraktion)
Propranolol	300	61,6
4-Hydroxypropranolol	200	0,4
Naphthoxylactic-acid	100	0,4
Konzentration in wässriger Lösung (Blindwert)		%-Transmission (nach Extraktion)
Propranolol	300	66,1
4-Hydroxypropranolol	200	0,25
Naphthoxylactic-acid	100	0,23
Konzentration in wässriger Lösung (Stammlösung)		%-Transmission (vor Extraktion)
Propranolol	300	70,0
4-Hydroxypropranolol	200	2,5
Naphthoxylactic-acid	100	30,0

Tab. 16: Vorversuch zur quantitativen Bestimmung von Propranolol im Kaninchen-
plasma
(Die Werte sind jeweils gemittelt aus 3 Proben)

Aus dem Vorversuch geht hervor, daß Propranolol zu 93,6 % aus Plasma extrahiert werden kann. Außerdem werden die beiden Hauptmetaboliten 4-Hydroxypropranolol und Naphtoxylactic-acid bei der fluorimetrischen Messung nicht erfasst. Das ist zum Teil darin begründet, daß das Plasma vor der Extraktion mit Heptan mit 1 N-NaOH alkalisiert wird; dadurch liegt der "saure Metabolit" Naphthoxylactic-acid als Anion in der wässrigen Phase vor und wird mit Heptan nicht extrahiert. Wie aus dem Vorversuch weiterhin hervorgeht, ist die Fluoreszenz von 4-Hydroxypropranolol bei einer Anregungswellenlänge von 300 nm und bei einer Emissionswellenlänge von 343 nm so gering (siehe %-Transmission der Stammlösung), daß dieser Metabolit durch die verwendete Meßmethode nicht erfaßt wird. Dies steht in Einklang mit Untersuchungen von Capomacchia et al. (106), welche für 4-Hydroxypropranolol ein Fluoreszenzmaximum bei 420 nm beschreiben.

Hauptversuche

Die Arzneistoffkonzentration in Plasma und in wässriger Lösung wurde folgendermaßen bestimmt:

pro Extraktionsversuch wurden 3 Leerwerte (= Plasma ohne Pharmakon), 3 Blindwerte (= wässrige Arzneistofflösung bekannter Konzentration) und 3 Versuchsproben extrahiert; die Messung des extrahierten Arzneistoffs erfolgte nach C.V.3.; die Arzneistoffkonzentration der Versuchsprobe, vermindert um den Leerwert, wurde mit Hilfe der Konzentration des Blindwertes nach Extraktion berechnet = Methode des externen Standards; die Mittelwerte wurden gebildet und der Standardfehler berechnet.

Quantitative Bestimmung von Thiopental im Plasma:

Das von Brodie (90) beschriebene Verfahren wurde wie folgt abgewandelt:

1 ml Plasma + 1 ml 1,5 Mol/l Na_2HPO_4 -Lsg. + 4 ml Hexan

- ↓
1. 20 min schütteln
2. 5 min zentrifugieren
↓ 3. organische Phase abpipettieren

Vorgang 3 mal wiederholen; die gesammelte organische Phase am Rotavapor zur Trockne eindampfen, Reste von Hexan mit N_2 vertreiben; Rückstand (= Arzneistoff) kurz vor dem Messen in 1 ml Methanol zur Chromatographie aufnehmen und wie unter C.V.3.a. beschrieben mit HPLC bestimmen.

Die Extraktionsausbeute betrug 96 %, bezogen auf eine ebenso behandelte wässrige Lösung des Arzneistoffs.

Quantitative Bestimmung von Chinidin im Plasma:

Die Bestimmung konnte ohne Extraktion direkt im Plasma durchgeführt werden (12):

100 μl Plasma + 200 μl Methanol (für die Fluoreszenzspektroskopie)

5 min zentrifugieren bei 15 000 g

nach Ausfällen der Proteine mit Methanol befindet sich das Pharmakon im Überstand gelöst; dieser wird direkt mit HPLC unter Verwendung einer Vorsäule analysiert, wie unter C.V.3.a. beschrieben.

Die Wiederfindungsrate im Plasma betrug 93,1 %, verglichen mit einer ebenso behandelten wässrigen Lösung des Arzneistoffs.

Auch bei der Bestimmung der Konzentration von Thiopental und Chinidin in wässriger Lösung nach Dialyse bzw. nach Ultrafiltration wurden die Proben direkt -ohne Extraktion- analysiert nach C.V.3.a.

V.2. Bestimmung der Arzneistoffkonzentration im Gewebe

Geräte und Materialien:

Rotavapor, Fa. Büchi, Schweiz; Schüttler; Runne Zentrifuge, Heidelberg; Digitalwaage Typ 1205, Fa. Sartorius, Göttingen; Mikropipette "Microman" M 250, Fa. Abimed, Düsseldorf; Homogenisator "Tornado", Fa. Emmendinger Maschinenbau; Chloroform, Petroläther, Heptan (technischer Reinheitsgrad); Diäthyläther (wasserfrei), Hexan, Toluol, pro analysi, Fa. Merck; sonstige Chemikalien, pro analysi, Fa. Merck, Darmstadt.

Durchführung:

Um die Gesamtkonzentration der Pharmaka im Gewebe der Versuchstiere zu bestimmen, wurden die tiefgefroren aufbewahrten Organe aufgetaut, mit dem Messer in kleine Stücke geschnitten und mit soviel aqua demineralisata versetzt, daß 100 g der Gewebesuspension 20,0 g Gewebe enthielten. Die Gewebesuspension wurde im Eisbad mit dem "Tornado" 3 min bei 10 000 Umdrehungen/min homogenisiert. Aus einer genau abgewogenen Menge des jeweiligen Gewebehomogenates wurde der Arzneistoff nach dem in Tab.14 (S.98) für die Extraktion aus Plasma und wässriger Lösung beschriebenen Verfahren extrahiert (Methoden zur Bestimmung der Arzneistoffkonzentration im Gewebe sind in der Literatur nur selten beschrieben).

Vorversuche

Zunächst wurde die Extraktionsausbeute der Pharmaka aus dem Gewebehomogenat überprüft:

eine wässrige Arzneistofflösung bekannter Konzentration wurde dem Gewebehomogenat zugefügt und nach dem in der Literatur beschriebenen Verfahren extrahiert. Die gewählte Arzneistoffkonzentration lag im Bereich der in vivo zu erwartenden Konzentration. Nach Extraktion wurde die Wiederfindungsrate, verglichen mit einer ebenso behandelten wässrigen Arzneistofflösung, berechnet. Es wurden nur diejenigen Verfahren zur Extraktion aus Gewebe verwendet, bei denen die Wiederfindungsrate mindestens 80 % betrug.

Um einen durchschnittlichen "Leerwert" zu ermitteln, wurde Gewebehomogenat ohne Pharmakon extrahiert; der Leerwert war in der Regel -verglichen mit den Meßdaten- ziemlich klein.

Hauptversuche

Die Bestimmung der Arzneistoffkonzentration im Gewebe lief folgendermaßen ab:

pro Extraktionsversuch wurden 3 Blindwerte (= wässrige Arzneistofflösung bekannter Konzentration) und 3 Versuchsproben extrahiert; die Messung der extrahierten Pharmaka erfolgte nach C.V.3; die Arzneistoffkonzentration der Versuchsproben, vermindert um den Leerwert, wurde mit Hilfe der Arzneistoffkonzentration der Blindwerte nach Extraktion berechnet = Methode des externen Standards; die Mittelwerte wurden gebildet und der Standardfehler berechnet.

Für die Arzneistoffe Chinidin, Diazepam, Imipramin und Thiopental wurde selbständig ein Verfahren zur Extraktion aus dem Gewebe entwickelt, da die Verfahren aus Tab.14 (Extraktion aus Plasma) meist nicht genügend "saubere" Proben für die HPLC-Analyse lieferten, wenn sie auf die Gewebeextraktion übertragen wurden.

Chinidin

1 g Gewebehomogenat + 1 ml 0,1 N-NaOH + 12 ml Toluol

- ↓
1. 30 min schütteln
 2. 5 min zentrifugieren
 - ↓ 3. Toluolphase abpipettieren

den Vorgang 1 mal wiederholen;

gesammelte Toluolphase + 2 ml 0,1 N-HCl

- ↓
1. 30 min schütteln
 - ↓ 2. Toluolphase verwerfen

das in der wässrigen Phase angereicherte Chinidin wird mit HPLC nach C.V.3.a. gemessen.

In Vorversuchen wurden die Wiederfindungsrate und der Variationskoeffizient ermittelt.

Wiederfindungsrate (%)		rel. Variationskoeffizient (%)
LEBER	85,0	0,7
LUNGE	86,6	3,0
NIERE	92,4	1,4
MUSKEL	91,3	2,7

Pro g Gewebe waren 4 µg Chinidinbisulfat • 4 H₂O zugesetzt; Mittelwerte aus 3 Proben.

Diazepam

1,0 g Gewebehomogenat + 1 ml Borat-Puffer pH 9 + 6 ml Diäthyläther

1. 30 min schütteln
2. 5 min zentrifugieren
- ↓ 3. Diäthylätherphase abpipettieren

den Vorgang 1 mal wiederholen;

die gesammelte Diäthylätherphase vorsichtig zur Trockne eindampfen; Ätherreste mit N₂ vertreiben; Rückstand in 200 µl des HPLC-Laufmittels kurz vor dem Messen aufnehmen (C.V.3.a.).

Im Tierversuch lagen die Gewebekonzentrationen niedriger als erwartet; daher wurde das Gewebe nach Zugabe von nur 1 Gewichtsteil Wasser homogenisiert und extrahiert; die dadurch entstandenen niedrigeren Extraktionsausbeuten wurden bei der Bestimmung der absoluten Gewebekonzentration rechnerisch entsprechend berücksichtigt.

In Vorversuchen wurden die Wiederfindungsraten und der Variationskoeffizient ermittelt; dabei waren pro g Gewebe 2 µg Diazepam zugesetzt; die Werte sind gemittelt aus 3 Proben.

Wiederfindungsrate (%) rel. Variationskoeffizient (%)

LEBER	53,2	8,6
LUNGE	49,5	5,7
NIERE	50,6	7,7
MUSKEL	50,8	6,9

Imipramin

2,0 g Gewebehomogenat + 1 ml 1 N-NaOH + 20 ml Heptan

- ↓ 1. 30 min schütteln
2. 5 min zentrifugieren
- ↓ 3. Heptanphase abpipettieren

gesammelte Heptanphase + 2 ml 0,1 N-HCl

- ↓ 1. 30 min schütteln
2. 5 min zentrifugieren
- ↓ 3. Heptanphase verwerfen

wässrige Phase + 1 ml 1 N-NaOH + 15 ml Hexan (enthält 0,5 %
Diäthylamin)

- ↓ 1. 30 min schütteln
2. 5 min zentrifugieren
- ↓ 3. Hexanphase abpipettieren

Hexanphase vorsichtig zur Trockne eindampfen; Hexanreste mit N_2 entfernen; Rückstand (= Imipramin) in 1 ml Methanol zur Chromatographie kurz vor dem Messen aufnehmen (vgl. C.V.3.a.).

In Vorversuchen wurden die Wiederfindungsrate und der Variationskoeffizient ermittelt; dabei wurden pro g Gewebe 10 µg Imipramin zugesetzt; die Werte sind gemittelt aus 3 Proben.

Wiederfindungsrate (%) rel. Variationskoeffizient (%)

LEBER	101,4	2,0
LUNGE	102,9	7,6
NIERE	102,9	5,7
MUSKEL	110,9	2,6

Thiopental

1,0 g Gewebehomogenat + 1 ml 1,5 Mol/l NaH_2PO_4 -Lsg.
+ 4 ml Äthylacetat

- ↓
1. 30 min schütteln
2. 5 min zentrifugieren
3. Äthylacetatphase abpipettieren

den Vorgang 3 mal wiederholen;

die gesammelte organische Phase vorsichtig eindampfen; Äthylacetatreste mit N_2 vertreiben; Rückstand (= Thiopental) in 1 ml Methanol zur Chromatographie kurz vor dem Messen mit HPLC aufnehmen (vgl. C.V.3.a.)

In Vorversuchen wurden die Wiederfindungsrate und der Variationskoeffizient ermittelt.

Wiederfindungsrate (%)		rel. Variationskoeffizient (%)
LEBER	93,8	5,9
LUNGE	90,0	4,9
NIERE	89,9	8,6
MUSKEL	87,0	2,2

Pro g Gewebe waren 10 µg Thiopental zugesetzt; die Werte sind gemittelt aus 3 Proben.

V.3. Meßverfahren

V.3.a. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Geräte und Materialien:

HPLC-Analysensystem der Fa. GynkoteK, München, bestehend aus: GynkoteK Constant Flow Pump, Modell 600/200; 20 µl Einspritzschleife; C-R1B Chromatopac Integrator und Schreiber der Fa. Shimadzu, Düsseldorf;

Detektoren: Spektrophotometer SP-4, Fa. GynkoteK; Fluoromonitor III, Fa. Latek, Heidelberg; Fluoreszenz-Spektromonitor RF-530, Fa. Shimadzu, Düsseldorf;

Mikroliterspritze 0 - 25 µl, Fa. Hamilton, Bonaduz, Schweiz;

Ultraschallbad Sonorex, Fa. Bandelin, Berlin;

Membranfilter Typ FH, 0,5 µm Porengröße, Fa. Millipore Corporation, Massachusetts, USA;

Methanol und Acetonitril zur Chromatographie, Fa. Merck, Darmstadt;

das Wasser wurde zu HPLC-Zwecken gereinigt mit Milli-Q Reagent Water System, Typ ZD 2023084, Fa. Millipore;

Durchführung:

Zur Herstellung der mobilen Phase wurden die Bestandteile des Laufmittels gemischt, über ein Membranfilter filtriert und die Mischung 20 min lang mit Ultraschall entgast. Bei jeder Analysenprobe betrug die Einspritzmenge 20 µl.

Die Messung erfolgte jeweils mit Hilfe eines externen Standards (= Arzneistofflösung bekannter Konzentration). Die Auswertung der Meßsignale erfolgte über eine Peakflächenbestimmung. Für die zu messenden Arzneistoffe wurden Eichgeraden im zu erwartenden Meßbereich erstellt; Abb. 22 zeigt ein Beispiel.

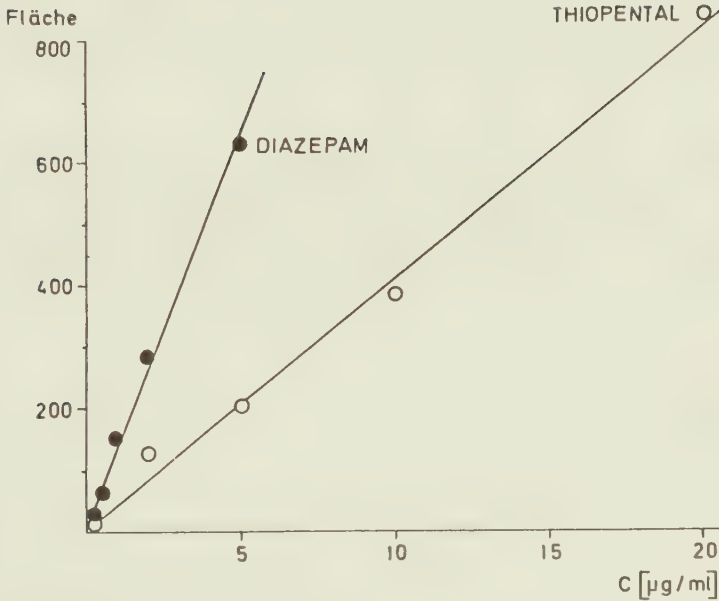


Abb. 22: Eichgerade zur Bestimmung der Thiopental- bzw. Diazepamkonzentration im Kaninchenplasma

Kaninchenplasma wurde mit Thiopental bzw. Diazepam derart versetzt, daß eine Konzentrationsreihe von 0 - 20 bzw. 0 - 5 µg/ml entstand (die Pharmakonzentrationen im Tierversuch lagen jeweils in diesem Bereich).

Nach der Extraktion aus dem Plasma (vgl. C.V.1.) wurden die Arzneistoffe mit HPLC analysiert, und die Konzentrationen wurden photometrisch bestimmt (die Meßsignale wurden über eine Peakflächenbestimmung ausgewertet).

Die Eichgeraden waren im gemessenen Bereich linear; der Korrelationskoeffizient betrug bei Diazepam 0,999, bei Thiopental 0,996.

Da die Proben aus den in vivo Untersuchungen auch Metaboliten des Pharmakons enthalten können, wurde überprüft, ob die Metaboliten von der HPLC-Säule getrennt von der Originalsubstanz eluiert werden. Wenn nichts anderes angegeben, wurden die Metaboliten durch die jeweilige Metaboliten-Reinsubstanz (Desipramin, Desmethyldiazepam, Pentobarbital) identifiziert.

Im folgenden ist das jeweilige Analysensystem für die mit HPLC gemessenen Pharmaka beschrieben. Dabei wurde als stationäre Phase stets eine "reversed-phase" verwendet, wobei die Silanolgruppen entweder mit C₁₈-Alkylgruppen oder mit Cyanopropylgruppen verbunden waren.

CHINIDIN

(modifiziert nach 12)

Stationäre Phase: Fertigsäule μ -Bondapak C 18 (Länge 30 cm), Fa. Waters Inc. Milford, Massachusetts, USA.

Bei der Messung von Chinidin im Plasma wurde eine Vorsäule vor die Hauptsäule geschaltet, um diese nicht mit eventuell im Plasmaüberstand noch vorhandenen Schwebstoffteilchen zu verunreinigen;

Vorsäule: Fa. Waters, gefüllt mit Bondapak C 18 Corasil.

Mobile Phase: Methanol-Wasser-Phosphorsäure (85 %) im Verhältnis 27 : 72,95 : 0,05

Flußgeschwindigkeit: 1,0 ml/min

Detektion: Fluoreszenzemission,

Anregung: 350 nm

Emission: > 420 nm

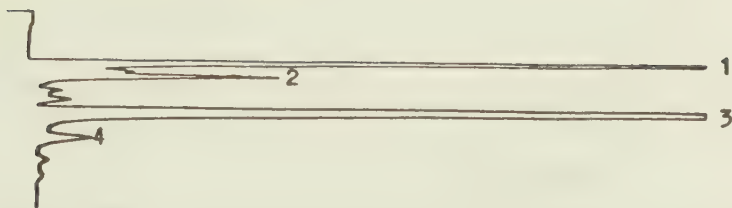


Abb. 23: Fluoreszenzchromatogramm nach HPLC von Chinidin im Kaninchenplasma nach fünfstündiger Dauerinfusion des Pharmakons

- 1 = Chinidin-10,11-dihydrodiol
- 2 = 6-Desmethylchinidin
- 3 = Chinidin
- 4 = Hydrochinidin

Die Metaboliten wurden in Anlehnung an Guentert et al. (12) identifiziert; Das von uns verwendete Chinidin enthielt noch geringe Mengen (8 %) an Hydrochinidin, was nach DAB 8 zulässig ist.

DIAZEPAM

(modifiziert nach (84))

Stationäre Phase: Fertigsäule Hyperchrome 5 μ ODS Hypersil (Länge 25 cm, Partikeldurchmesser 5 μ m), Fa. Bischoff, Leonsberg.

Mobile Phase: Methanol-Wasser im Verhältnis 65 : 35

Flußgeschwindigkeit: 1,5 ml/min

Detektion: UV 254 nm

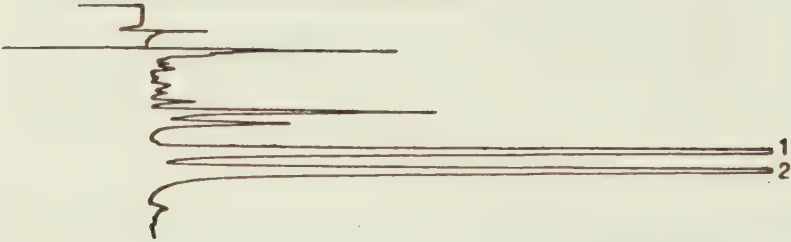


Abb. 24: UV-Chromatogramm nach HPLC von Diazepam im Kaninchenplasma nach
fünftündiger Dauerinfusion des Pharmakons

1 = Desmethyldiazepam

2 = Diazepam

IMIPRAMIN

(modifiziert nach (85))

Stationäre Phase: Fertigsäule Gynkochrom, 5µ CPS-Hypersil (Länge
12 cm, Partikeldurchmesser 5 µm), Fa. Gynkotec
München.

Mobile Phase: Acetonitril-0,03 Mol/l Acetat-Lsg. pH 7,0 im
Verhältnis 70 : 30

Flußgeschwindigkeit: 1,0 ml/min

Detektion: Fluoreszenzemission, Anregung: 252 nm

Emission: >360 nm

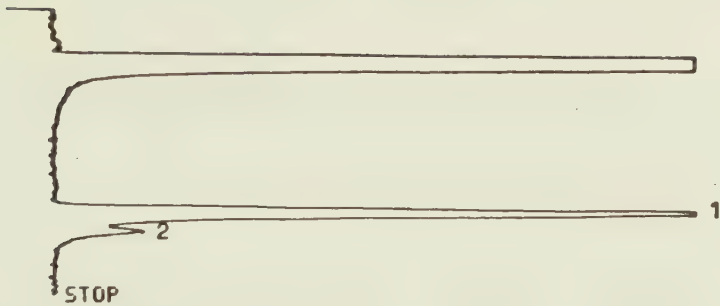


Abb.25 : Fluoreszenzchromatogramm nach HPLC von Imipramin im Kaninchenplasma nach fünfstündiger Dauerinfusion des Pharmakons

- 1 = Imipramin
- 2 = Desipramin

THIOPENTAL

(modifiziert nach (81))

Stationäre Phase: Fertigsäule hp-18 Nr. 79916 B (Länge 20 cm, Partikelgröße 10 μ m), Fa. Hewlett Packard, Berlin.

Mobile Phase: Methanol-Wasser im Verhältnis 60 : 40; die Mischung wurde mit Phosphorsäure auf pH 6,5 eingestellt.

Flußgeschwindigkeit: 1,0 ml/min

Detektion: UV 290 nm



Abb. 26 : UV-Chromatogramm nach HPLC von Thiopental im Kaninchenplasma nach fünfstündiger Dauerinfusion des Pharmakons

- 1 = Thiopental

V.3.b. Radiometrische Messung

Geräte und Materialien:

Packard Szintillationszähler TRI CARB Modell 3255 und Modell 3385
Fa. Packard, Palo Alto, Californien;
Digitalwaage Typ 1205, Fa. Sartorius, Göttingen.

Durchführung:

Die verwendeten radioaktiv markierten Pharmaka sind in Tab. 19 (S. 121) aufgeführt. Je nach ihrer spezifischen Aktivität wurden die Pharmaka entweder direkt oder nach Verdünnen mit nicht markierter Substanz eingesetzt. Dabei wurde die Menge an markierter Substanz so gewählt, daß nach Dialyse bzw. Ultrafiltration eine Zählrate von mindestens 1000 cpm pro 200 µl Probe zu erwarten war. Bei Verdünnen von markierter und nicht markierter Substanz wurde davon ausgegangen, daß sich beide hinsichtlich ihrer Bindung gleich verhalten.

Die Konzentration an radioaktiven Pharmakon wurde durch Flüssigszintillationsmessung bestimmt (Probenvolumen 200 µl). Die Szintillationsflüssigkeit wurde selbst hergestellt (Tab. 17).

Die Zählzeit wurde so gewählt, daß der relative Zählfehler $< 1\%$ war und somit kleiner war als der durchschnittliche Pipettierfehler.

Um einen Fehler durch "Quenchen" auszuschließen, wurden die cpm in dpm umgerechnet.

POPOP	1 g
PPO	20 g
Naphtalin	300 g
Methanol	50 ml
Äthylenglykol	100 ml
Dioxan	ad 5000 ml

Tab. 17: Zusammensetzung der Szintillationsflüssigkeit

POPOP = 1,4-bis-2-(Methyl-5-Phenoxazolyl)-Benzol
PPO = 2,5-Diphenyloxazol

V.3.c. Photometrische Messung

α: UV-Absorptionsmessung

Geräte:

Spektralphotometer PM Q 3, Fa. Zeiss, Oberkochen;
1 cm Quarzküvette.

Durchführung:

Es wurde die Absorption bei den unten angegebenen Wellenlängen bei $20 \pm 2^\circ \text{C}$ gegen das Lösungsmittel gemessen.

Barbital:	254 nm
Buphenin:	490 nm
Pentobarbital:	240 nm
Phenobarbital:	254 nm
Phenylbutazon:	265 nm

Um den linearen Meßbereich zu ermitteln, wurde für jede Substanz eine Eichgerade in wässriger Lösung erstellt.

β: Fluorometrische Bestimmung

Geräte:

Spektralphotofluorometer, Fa. Aminco Bowman (American Instrument Co.), Silver Spring, Maryland, USA; Kathodenstrahloszillograph, DuMont; 1 cm Quarzküvette.

Durchführung:

Nach Anregung bei entsprechender Wellenlänge wurde die Fluoreszenzemission bei $20 \pm 2^\circ \text{C}$ bestimmt.

	λ_{ex}	λ_{em}
Propranolol	295	360
Salicylsäure	315	420

λ_{ex} = Anregungswellenlänge (nm)
 λ_{em} = Emissionswellenlänge (nm)

Für Propranolol und Salicylsäure wurden Eichgeraden in wässriger Lösung im Bereich von 0 - 100 $\mu\text{g/ml}$ erstellt; Abb. 27 zeigt, daß die Konzentrationen von Propranolol und Salicylsäure bis 50 $\mu\text{g/ml}$ im linearen Meßbereich liegen; Konzentrationen größer als 50 $\mu\text{g/ml}$ müssen vor der Messung entsprechend verdünnt werden.

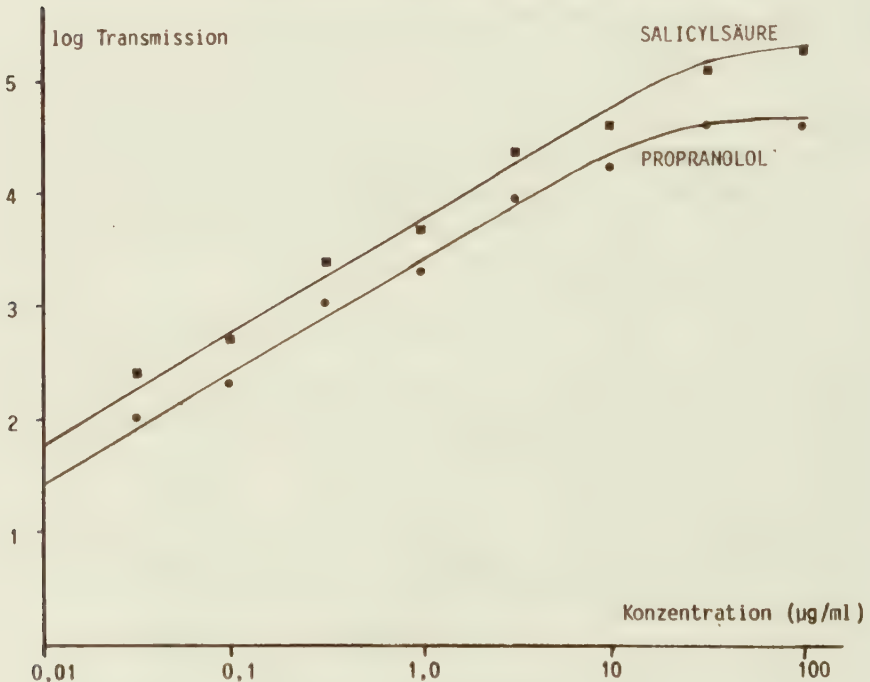


Abb. 27 : Eichgeraden für Propranolol und Salicylsäure in wässriger Lösung

C.VI. Rechnerische Auswertung der Meßdaten

Rechner: Hewlett Packard HP 97, Fa. Hewlett Packard, Berlin;
Olivetti P 6060, Fa. Olivetti, Frankfurt.

Durchführung:

Die statistischen Methoden wurden in Anlehnung an Sachs (62) verwendet.

Wenn nicht anders erwähnt, sind die Ergebnisse Mittelwerte ($\bar{x}$) aus 3 - 5 Versuchen. Da die Versuchszahl meist unterschiedlich war, wurde nicht die Standardabweichung sondern der Standardfehler des arithmetischen Mittels (S.E.) angegeben. Zusätzlich aufgeführt wurde die prozentuale Streuung um den Mittelwert, ausgedrückt durch den relativen Variationskoeffizient (V_{rel}).

Um zu prüfen, ob eine Korrelation zwischen zwei Reihen von Meßwerten -auch wenn diese nicht normalverteilt sind- besteht, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) errechnet und im einseitigen Test auf Signifikanz geprüft.

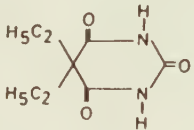
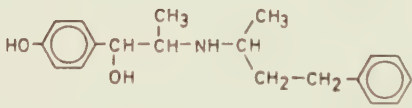
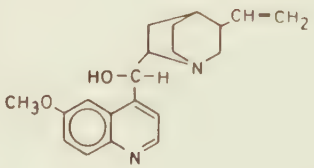
Zur Überprüfung eines linearen Zusammenhangs zwischen zwei Gruppen von Meßwerten wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt und die Regressionsgerade sowie der Korrelationskoeffizient (r) berechnet. Der Korrelationskoeffizient wurde im zweiseitigen Test auf Signifikanz geprüft.

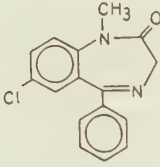
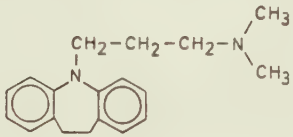
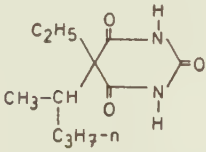
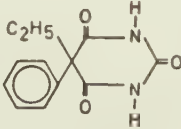
Die Zusammenhänge wurden in der Regel als signifikant betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit (p) kleiner als 0,05 war.

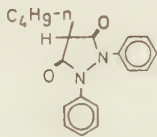
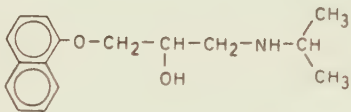
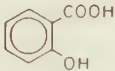
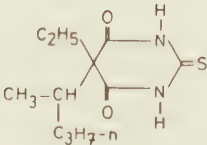
Zum Vergleich der Mittelwerte wurde der t-Test für verbundene Stichproben durchgeführt und im zweiseitigen Test auf Signifikanz geprüft.

D. T a b e l l e n a n h a n g

Tab. 18 : Übersicht über die verwendeten Pharmaka

FORMEL INN-BEZEICHNUNG (SALZ)	MOLEKULARGEWICHT (SALZ)	pK _a -WERT	BEZUGS- QUELLE
 BARBITAL (BARBITAL-NA)	184,2 (206,2)	7,8	Bayer, Leverkusen
 BUPHENIN (BUPHENIN-HCL)	299,0 (335,5)	8,9	Tropon, Köln
 CHINIDIN ★ (CHINIDIN H₂SO₄ · 4 H₂O)	324,4 (494,6)	8,6	Boehringer, Mannheim

 DIAZEPAM	284,4	3,3 Roche, Grenzach-Wyhlen
 IMIPRAMIN (IMIPRAMIN-HCL)	280,4 (316,9)	9,4 Geigy, Wehr
 PENTOBARBITAL (PENTOBARBITAL-NA)	226,3 (248,3)	8,0 Abbott, Ingelheim
 PHENOBARBITAL (PHENOBARBITAL-NA)	232,2 (254,2)	7,3 Bayer, Leverkusen

 PHENYLBUTAZON	308,1	4,5 Geigy, Wehr
 PROPRANOLOL (PROPRANOLOL-HCL)	247,3 (283,8)	9,5 ICI, Heidelberg
 SALICYLSAURE (SALICYLSÄURE-NA)	138,1 (160,1)	3,0 Merck, Darmstadt
 THIOPENTAL (THIOPENTAL-NA)	242,3 (264,3)	7,4 Byk-Gulden, Konstanz

★: nach Angaben der Firma enthielt die Substanz bis zu 15 % Hydrochinidin

Tab. 19: Übersicht über die verwendeten radioaktiv markierten Pharmaka

<u>PHARMAKON</u>	<u>ISOTOP</u>	<u>SPEZ. AKTIVITÄT</u> (Ci/mmol)	<u>REINHEIT</u> (%)	<u>BEZUGSQUELLE</u>
DIAZEPAM	^{14}C	0,057	99	AB
IMIPRAMIN	^3H	23,0	95	AB
PENTOBARBITAL	^{14}C	0,052	98	NEN
PHENOBARBITAL	^3H	8,1	98	NEN
PROPRANOLOL	^3H	22,0	98	AB
SALICYLSÄURE	^{14}C	0,052	98	NEN

AB = Amersham-Buchler, Braunschweig

NEN = New England Nuclear, Dreieich

Tab. 20 : Übersicht über die verwendeten Pufferlösungen

I. 0,125 Mol/l NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 -Puffer pH 7,0

Zusammensetzung: 0,5 Mol/l Na_2HPO_4 -Lösung 32,2 ml
 0,5 Mol/l NaH_2PO_4 -Lösung 17,8 ml
 aqua demineralisata 150,0 ml

Ionenstärke: (25 °C) 0,18

II. 0,125 Mol/l NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 -Puffer pH 7,4

Zusammensetzung: 0,5 Mol/l Na_2HPO_4 -Lösung 41,1 ml
 0,5 Mol/l NaH_2PO_4 -Lösung 8,9 ml
 aqua demineralisata 150,0 ml

Ionenstärke: (25 °C) 0,16

III. Borat-Puffer pH 9

Zusammensetzung:

0,2 Mol/l Borsäure-Lösung 50,0 ml
0,05 Mol/l Borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$)-Lösung 59,0 ml
 aqua demineralisata ad 200,0 ml

Die Herstellung der Pufferlösung geschah in Anlehnung an
Rauen, Biochemisches Taschenbuch (61)

Tab. 21: Verteilungskoeffizienten Lipid/Wasser der unter-
suchten Pharmaka

	<u>Verteilungskoeffizient</u> <u>Oktanol-Puffer pH = 7</u>	<u>Verteilungskoeffizient</u> <u>Heptan-Puffer pH = 7</u>
BARBITAL	4,5	0,001
CHINIDIN	48	0,082
DIAZEPAM	720	*150
IMIPRAMIN	146	47,3
PHENOBARBITAL	21	0,005
PHENYLBUTAZON	6,1	**0,48
PENTOBARBITAL	124	0,047
PROPRANOLOL	5,4	0,046
SALICYLSÄURE	0,02	*** $2,4 \cdot 10^{-5}$
THIOPENTAL	846	1,4

*: nach van der Kleijn E. (107)

** : nach Seebald H. und Forth W. (108)

***: nach Hansch C. und Leo A. (101)

Tab. 22: Plasmabindung, Verteilung der Pharmaka zwischen Plasma und Muskelgewebe und Verteilungsvolumina der Pharmaka bei Kaninchen

Die Plasmabindung wurde durch Dialyse (Pharmakonzentration 10^{-5} Mol/l) bestimmt;
die Verteilungskoeffizienten Muskel/Plasma wurden durch in vivo Verteilungsstudien ermittelt.

	<u>Plasmabindung (%)</u>	<u>Verteilungskoeffizient</u> <u>Muskel/Plasma</u>	<u>Verteilungs-</u> <u>volumen (l/kg)</u>
BARBITAL	27,0	0,72	0,48
BUPHENIN	56,5	2,7	1,8
CHINIDIN	91,1	1,86	4,2
DIAZEPAM	91,0	0,94	5,5
IMIPRAMIN	82,1	8,5	12,8
PHENOBARBITAL	65,5	0,69	0,51
PHENYLBUTAZON	97,5	0,09	0,19
PENTOBARBITAL	64,3	0,99	0,81
PROPRANOLOL	65,5	4,8	14,4
SALICYLSÄURE	89,0	0,14	0,16
THIOPENTAL	85,1	0,49	1,1

E. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwieweit man anhand von Ergebnissen aus in vitro Bindungsstudien mit Gewebehomogenaten die Verteilung von Pharmaka im Organismus vorhersagen kann, ob diesbezüglich die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Pharmaka von Bedeutung sind und welcher Zusammenhang zwischen der Plasmabindung und der Gewebefindung von Pharmaka besteht. Außerdem untersuchten wir, ob sich der Muskel in vivo als ein einheitliches Kompartiment verhält und welche pharmakokinetische Bedeutung ihm auf Grund seines großen Anteils am Körpergewicht (40 %) zukommt.

Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der untersuchten Pharmaka umfassten ein breites Spektrum: es wurden 6 Säuren (Barbital, Pentobarbital, Phenobarbital, Phenylbutazon, Salicylsäure, Thiopental) und 5 Basen (Buphenin, Chinidin, Diazepam, Imipramin, Propranolol) untersucht; der Ionisationsgrad lag bei physiologischem pH-Wert zwischen nahe 0 % und 99 %; bezüglich des Verteilungskoeffizienten Oktanol/Puffer unterschieden sich die einzelnen Pharmaka bis zu 5 log Einheiten.

Die Verteilungsstudien in vivo wurden an nicht narkotisierten Kaninchen durchgeführt. Als Maß für die Verteilung der Pharmaka zwischen Plasma und Gewebe im Organismus diente der Verteilungskoeffizient Gewebe/Plasma; dieser ist definiert als der Quotient aus der Gesamtkonzentration des Pharmakons im Gewebe und der Gesamtkonzentration des Pharmakons im Plasma (= Ges.Konz.Gewebe/Ges.Konz.Plasma). Der VK-Gewebe/Plasma wurde entweder 3 h nach i.v. Bolus-Gabe oder 5 h nach Dauerinfusion des Pharmakons bestimmt. Pharmaka, bei welchen beide Versuchstypen durchgeführt wurden, zeigten keine Unterschiede bezüglich ihrer VK-Gewebe/Plasma.

Die in vitro Bindungsdaten der Pharmaka an Plasma wurden durch Dialyse, die an Gewebe durch Ultrafiltration verdünnter Gewebemogenate bestimmt. Unter der Voraussetzung, daß im Gleichgewicht die Pharmakonkonzentration im Gewebewasser und im Plasmawasser gleich groß ist, wurden aus den in vitro Bindungsdaten die Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma berechnet und mit den in vivo gemessenen verglichen.

Die quantitative Bestimmung der Pharmaka wurde bei den in vitro Bindungsstudien vor allem mit der radiometrischen Tracer-Methode, bei den in vivo Versuchen mit HPLC oder optischen Methoden durchgeführt.

Im wesentlichen ergaben sich folgende Befunde:

1. Für das Organ Muskel ergab sich eine gute Übereinstimmung zwischen den in vivo gemessenen und den aus in vitro Bindungsdaten berechneten Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma; daher war es möglich, die Verteilung der Pharmaka in vivo anhand von Ergebnissen aus in vitro Bindungsstudien in guter Näherung vorherzusagen.
2. Auch für die Organe Leber, Lunge und Niere bestanden deutliche Korrelationen zwischen in vivo gemessenen und aus in vitro Bindungsdaten berechneten Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma. Allerdings waren die für kationische, lipophile Arzneistoffe in vivo gemessenen Werte der Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma in Lunge und Niere zum Teil erheblich höher als man auf Grund der durch in vitro Bindungsstudien berechneten Verteilungskoeffizienten erwartet hätte; dagegen waren bei Imipramin und Propranolol die in vivo gemessenen Werte der Verteilungskoeffizienten Gewebe/Plasma für das Organ Leber -bedingt durch die rasche Metabolisierung dieser Pharmaka in der Leber- niedriger als die anhand der in vitro Bindungsstudien errechneten.
3. In der Regel ließ sich die Verteilung von nicht dissoziierten (z.B. Diazepam) und anionischen Pharmaka (z.B. Barbiturate, Salicylsäure, Phenylbutazon) für alle untersuchten Gewebe gut vorhersagen. Die Verteilung der kationischen, lipophilen Pharmaka im Organismus war nur für das Organ Muskel vorherzusagen.

4. Zwischen der Plasmabindung der Pharmaka und der Gewebefindung in vitro bestand kein Zusammenhang. Dagegen ergaben sich gute Korrelationen zwischen den einzelnen Geweben (Leber, Lunge, Niere, Muskel) bezüglich ihrer Fähigkeit Pharmaka zu binden. Dieser Sachverhalt konnte auch durch die in vivo Untersuchungen bestätigt werden.

Daraus konnte geschlossen werden, daß der Bindung der Pharmaka an Albumin, welches in Plasma und Gewebe gleichermaßen vorkommt, bei der Gewebefindung eine geringe Bedeutung zukommt.

5. Bei den Verteilungsstudien von Chinidin in vivo fand sich eine Besonderheit: beim Vergleich der für jedes Versuchstier in vivo gemessenen Bindungsdaten fand sich eine enge Korrelation zwischen Gewebe- und Plasmabindung.

Dieser Befund kann als der Beweis der von Guentert et al. (55) aufgestellten Vermutung betrachtet werden, daß es bei Chinidin einen Zusammenhang zwischen Plasma- und Gewebefindung bei Kaninchen geben müsse.

6. Verschiedene Arten von Muskelgewebe unterschieden sich signifikant bezüglich ihrer Fähigkeit Pharmaka zu binden: die untersuchten Pharmaka wurden am stärksten an Herzmuskel -vermutlich wegen seines hohen Gehaltes an Phospholipiden- gebunden; rotes Muskelgewebe konnte Chinidin, Diazepam und Imipramin stärker binden als weißes, wohingegen bei Thiopental kein Unterschied festgestellt wurde; Zwerchfell verhielt sich wie rotes Muskelgewebe.

7. Zwischen dem Verteilungskoeffizienten Lipid/Wasser der unionisierten Pharmaka und den Bindungsdaten der unionisierten Pharmaka an Muskelgewebe bestand ein Zusammenhang. Anhand des Bestimmtheitsmaßes ließ sich feststellen, daß nur etwa 46 % der Bindung an das Muskelgewebe von der Lipophilie der Pharmaka bestimmt werden.

8. Das Muskelgewebe ist auf Grund seiner großen Masse bei der mengenmäßigen Verteilung der Pharmaka im Organismus von Bedeutung: der größte Teil der verabreichten Pharmakonmenge befindet sich im Muskelgewebe; auch bei Pharmaka mit sehr hoher Plasmabindung und geringem Verteilungsvolumen (Salicylsäure, Phenylbutazon) ist die im Plasma befindliche Arzneistoffmenge der im Muskelgewebe vergleichbar.

9. Zwischen dem Verteilungsvolumen und den in vitro Bindungsdaten der Pharmaka an Muskelgewebe ergab sich ein enger Zusammenhang: Wegen der grundlegenden pharmakokinetischen Beziehung $t_{1/2} = \ln 2 \cdot V/Cl$ kommt diesem Befund eine wichtige Funktion zu. Weil darüber hinaus gezeigt werden konnte (66), daß bei einer Reihe von Pharmaka zwischen dem Verteilungsvolumen der freien Substanz bei Kaninchen und dem beim Menschen eine enge Korrelation besteht, kann gefolgert werden, daß durch die Kenntnis der in vitro Bindungsdaten an Muskelgewebe und an Plasma von Kaninchen eine Aussage über das Verteilungsvolumen einer Substanz im menschlichen Organismus gemacht werden kann. Dies ist vor allem bei der Erstanwendung von Pharmaka im menschlichen Organismus von großer Wichtigkeit.

F. L i t e r a t u r

- (1) Bischoff K.B., Dedrick R.L.
Thiopental pharmacokinetics
J. Pharm. Sci. 57: 1346 - 1351 (1968)
- (2) Chen C.N., Coleman D.L., Andrade J.D., Temple A.R.
Pharmacokinetic model for salicylate in cerebrospinal fluid, blood, organs and tissues
J. Pharm. Sci. 67: 38 - 45 (1978)
- (3) Benowitz N., Forsyth R.P., Melmon K.C., Rowland M.M.
Lidocaine disposition kinetics in monkey and man
I. Prediction by a perfusion model
Clin. Pharmacol. Ther. 16: 87 - 109
- (4) Bischoff K.B., Dedrick R.L., Zaharko D.S.
Preliminary model for methotrexate pharmacokinetics
J. Pharm. Sci. 59: 149 - 154 (1970)
- (5) Harrison, L.I., Gibaldi M.
Physiologically based pharmacokinetic model for digoxin distribution and elimination in the rat
J. Pharm. Sci. 66: 1138 - 1142 (1977)
- (6) Lin J.H., Sugiyama Y., Awazu S., Hanano H.
Physiological pharmacokinetics of ethoxybenzamide based on biochemical data obtained in vitro as well as on physiological data
J. Pharmacokin. Biopharm. 10: 649 - 661 (1982)
- (7) Igari Y., Sugiyama Y., Awazu S., Hanano H.
Comparative physiologically based pharmacokinetics of hexobarbital, phenobarbital and thiopental in the rat
J. Pharmacokin. Biopharm. 10: 53 - 75 (1982)

- (8) Fichtl B., Bondy B., Kurz H.
Binding of drugs to muscle tissue: dependence on drug concentration and lipid content of tissues
J. Pharmacol. Exp. Ther. 215: 248 - 253 (1980)

- (9) Igari Y., Sugiyama Y., Sawada Y., Iga T., Hanano M.
Prediction of diazepam disposition in the rat and man by a physiologically based pharmacokinetic model
J. Pharmacokin. Biopharm. 11: 577 - 593 (1983)

- (10) Herzfeldt C.D.
Dissoziationskonstanten von Arzneistoffen - Eine Übersicht
Pharm. Ztg. 125: 608 - 614 (1980)

- (11) Kaneniwa N., Hiura M., Nakagawa S.
Effect of lipid solubility and dose on the elimination of barbiturates in rabbits
Chem. Pharm. Bull. 27: 1501 - 1509 (1979)

- (12) Guentert T.W., Huang J.D., Øie S.
Disposition of quinidine in the rabbit
J. Pharm. Sci. 71: 812 - 815 (1982)

- (13) Klotz U., Antonin K.H., Bieck P.R.
Pharmacokinetics and plasma binding of diazepam in man, dog, rabbit, guinea pig and rat
J. Pharmacol. Exp. Ther. 199: 67 - 73 (1976)

- (14) Dingell J.V., Sulser F., Gilette J.R.
Species differences in the metabolism of imipramine and desmethylimipramine (DMI)
J. Pharmacol. Exp. Ther. 143: 14 - 22 (1964)

- (15) Gibaldi M., McNamara P.J.
Apparent volumes of distribution and drug binding to plasma proteins and tissues
Eur. J. Clin. Pharmacol. 13: 373 - 378 (1978)

- (16) Eling T.E., Pickett R.D., Orton T.C., Anderson M.W.
A study of the dynamics of imipramine accumulation in
the isolated perfused rabbit lung
Drug Metabol. Disp. 3: 389 - 399 (1975)
- (17) Guentert T.W., ~~Die~~ S.
Factors influencing the apparent protein binding of
quinidine
J. Pharm. Sci. 71: 325 - 328 (1982)
- (18) Kristensen C.B., Gram L.F.
Equilibrium dialysis for determination of protein binding
of imipramine - evaluation of a method
Acta Pharmacol. et Toxicol. 50: 130 - 136
- (19) Ludden T., Schanker L.S., Lanman R.C.
Binding of organic compounds to rat liver and lung
Drug Metabol. Disp. 4: 8 - 16 (1976)
- (20) Wosilait W.D., Ryan M.P., Byington K.H.
Competition between serum albumin and soluble fraction
of liver for binding of warfarin and other drugs
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 32: 113-121 (1981)
- (21) Sammereier J.
Konzentrationsabhängigkeit der Pharmakonbindung an Leber-
gewebe von Kaninchen
Dissertation, Universität München 1983
- (22) Dollery C.T., Junod A.F.
Concentration of (+)-propranolol in isolated, perfused
lungs of rats
Brit. J. Pharmacol. 57: 67 - 71 (1976)
- (23) Evans G.H., Wilkinson G.R., Shand D.G.
The disposition of propranolol IV. A dominant role for
tissue uptake in the dose-dependent extraction of
propranolol by the perfused rat liver
J. Pharmacol. Exp. Ther. 186: 447 - 454 (1973 b)

- (24) Fichtl B.
Untersuchungen zur Gewebefindung von Pharmaka
Habilitationsschrift, Universität München 1983
- (25) Stegmann R., Bickel M.H.
Dominant role for tissue binding in the first pass extraction of imipramine by the perfused rat liver
Xenobiotica 7: 737 - 746 (1977)
- (26) Kalser S.C., Kelly M.P., Forbes E.B., Randolph M.M.
Drug metabolism in hypothermia. Uptake, metabolism and biliary excretion of pentobarbital-2-C¹⁴ by the isolated, perfused rat liver in hypothermia and euthermia
J. Pharmacol. Exp. Ther. 170: 145 - 152 (1969)
- (27) Anderson J.H., Anderson R.C., Iben L.S.
Hepatic uptake of propranolol
J. Pharmacol. Exp. Ther. 206: 172 - 180 (1978)
- (28) Junod A.F.
Accumulation of ¹⁴C-imipramine in isolated perfused rat lungs
J. Pharmacol. Exp. Ther. 183: 182 - 187 (1972)
- (29) Balzer H., Makinose M., Fiehn W., Hasselbach W.
The binding of the calcium transport inhibitors reserpine, chlorpromazine and prenylamine to the lipids of the membrane of the sacroplasmatic reticulum
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 260: 456-473 (1968)
- (30) Himmelstein K.J., Lutz R.J.
A review of the applications of physiologically based pharmacokinetic modeling
J. Pharmacokin. Biopharm. 7: 127 - 145 (1979)

- (31) Schneck D.W., Pritchard J.F., Hayes A.H.jr.
Studies on the uptake and binding of propranolol by rat tissues
J. Pharmacol. Exp. Ther. 203: 621 - 629 (1977)
- (32) George C.F., Orme M.L.'E., Buranapong P., Macerlean D., Breckenridge A.M., Dollery C.T.
Contribution of the liver to overall elimination of propranolol
J. Pharmacokin. Biopharm. 4: 17 - 27 (1976)
- (33) Shand D.G., Rangno R.E., Evans G.H.
The disposition of propranolol II. Hepatic elimination in the rat
Pharmacology 8: 344 - 352 (1972)
- (34) Weiner I.M.
Excretion of drugs by the kidney
In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, B.B. Brodie u. J.R. Gillette (Hrsg.), Vol. 28/1, S. 328 - 353
Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (1971)
- (35) Angeviné L.S., Mehendale H.M.
Chlorphentermine uptake by isolated perfused rabbit lung
Toxicol. Appl. Pharmacol. 52: 336 - 346 (1980)
- (36) Orton T.C., Anderson M.W., Pickett R.D., Eling T.E., Fouts J.R.
Xenobiotic accumulation and metabolism by isolated perfused rabbit lungs
J. Pharmacol. Exp. Ther. 186: 482 - 497 (1973)
- (37) Anderson M.W., Orton T.C., Pickett R.D., Eling T.E.
Accumulation of amines in the isolated perfused rabbit lung
J. Pharmacol. Exp. Ther. 189: 456 - 466 (1974)

- (38) Wilson A.G.E., Pickett R.D., Eling T.E., Anderson M.W.
Studies on the persistence of basic amines in the rabbit lung
Drug Metabol. Disp. 7: 420 - 424 (1979)
- (39) Blanck T.J.J., Gillis C.N.
 β -adrenergic receptor ligand binding by rabbit lung
Biochem. Pharmacol. 28: 1903 - 1909 (1979)
- (40) Drew R., Siddik Z.H., Mimnaugh E.G., Gram T.E.
Species and dose differences in the accumulation of imipramine by mammalian lungs
Drug Metabol. Disp. 9: 322 - 326 (1981)
- (41) Graf E., El-Menshawy M.
 pK_a - und VK-Messungen an Benzodiazepinen
Pharmazie in unserer Zeit 6: 171 - 178 (1977)
- (42) Khalafallah N., Jusko W.J.
Determination and prediction of tissue binding of prednisolon in the rabbit
J. Pharm. Sci. 73: 362 - 366 (1984)
- (43) Krieglstein J.
Zur Plasmaproteinbindung von Arzneimitteln
Klin. Wochenschrift 47: 1125 - 1130 (1969)
- (44) v. Schwarzenfeld I.
Plasmaeiweißbindung
Pharmazie 29: 497 - 505 (1974)
- (45) Brinkschulte M., Breyer-Pfaff U.
The contribution of α_1 -acid glycoprotein, lipoproteins and albumin to the plasma binding of perazine, amitriptyline and nortriptyline in healthy man
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 314: 61-66 (1980)

- (46) Oppenheimer J.H., Schwartz H.L., Koerner D., Surks M.I.
Limited binding capacity sites for L-triiodothyronine in
rat liver nuclei
J. Clin. Invest. 53: 768 - 777 (1974)
- (47) Kurnick N.B., Radcliffe I.E.
Reaction between DNA and quinacrine and other anti-
malarials
J. Lab. Clin. Med. 60: 669 - 688 (1962)
- (48) Deguchi T., Ishii A., Tanaka M.
Binding of aminoglykoside antibiotics to acidic
mucopolysaccharides
J. Antibiot. 31: 150 - 155 (1978)
- (49) Charest-Boule L., Chakraborti S., Brodeur
Influence of free fatty acid anion on the binding of
warfarin to cytoplasmatic proteins from rat liver
Chem. Biol. Interact. 29: 85 - 94 (1980)
- (50) Bickel M.H., Steele J.W.
Binding of basic and acidic drugs to rat tissue
subcellular fractions
Chem. Biol. Interact. 8: 151 - 162 (1974)
- (51) Lüllmann H., Wehling M.
The binding of drugs to different polar lipids in vitro
Biochem. Pharmacol. 28: 3409 - 3415 (1979)
- (52) Faed E.M.
Protein binding of drugs in plasma, interstitial fluid
and tissues: Effect on pharmacokinetics
J. Clin. Pharmacol. 21: 77 - 81 (1981)
- (53) Jusko W.J., Gretch M.
Plasma and tissue protein binding of drugs in
pharmacokinetics
Drug Metabol. Rev. 5: 43 - 140 (1976)

- (54) Kates E.R., Sokoloski T.D., Comstock T.J.
Binding of quinidine to plasma proteins in normal subjects and in patients with hyperlipoproteinemias
Clin. Pharmacol. Ther. 23: 30 - 35 (1978)
- (55) Guentert T.W., Die S.
Effect of plasma protein binding on quinidine kinetics in the rabbit
J. Pharmacol. Exp. Ther. 215: 165 - 171 (1980)
- (56) Nilsen O.G.
Serum albumin and lipoproteins as the quinidine binding molecules in normal sera
Biochem. Pharmacol. 25: 1007 - 1012 (1976)
- (57) Fremstad D., Bergerud K., Haffner J.F.W., Lunde P.K.M.
Increased plasma binding of quinidine after surgery: A preliminary report
Eur. J. Clin. Pharmacol. 10: 441 - 444 (1976)
- (58) Yacobi A., Levy G.
Comparative pharmacokinetics of coumarin anticoagulants XIV: Relationship between protein binding, distribution and elimination kinetics of warfarin in rats
J. Pharm. Sci. 64: 1660 - 1664 (1975)
- (59) Armin J., Grant R.T., Pels H., Reeve E.B.
The plasma, cell and blood volumes of albino rabbits as estimated by the dye T1824 and 32P marked cell methods
J. Physiol. 116: 59 - 73 (1952)
- (60) Scheunert A., Trautmann A. (Hrsg.)
Lehrbuch der Veterinär-Physiologie
Berlin - Hamburg, 1976 (5. Auflage)
- (61) Rauen H.M. (Hrsg.)
Biochemisches Taschenbuch
Springer, Berlin - Göttingen - Heidelberg (1956)

- (62) Sachs L.
Angewandte Statistik
Springer, Berlin - Heidelberg - New York (1974)
- (63) Kostetskii E.Y., Gerasimenko H.J., Kushnerova N.F.
Phospholipid composition of various rabbit organs and tissues
Biokhimiya 42: 672 - 676 (1977)
- (64) Harashima H., Sugiyama Y., Sawada Y., Iga T., Hanano M.
Comparision between in-vivo and in-vitro tissue-to-plasma unbound concentration ratios ($K_{p,f}$) of quinidine in rats
J. Pharm. Pharmacol. 36: 340 - 342 (1984)
- (65) Fremstad D., Jacobsen S.
Binding of quinidine in serum and heart from normal and anuric rats, and the significance for distribution
Biochem. Pharmacol. 28: 2611 - 2616 (1979)
- (66) Fichtl B.
Interspecies variability of distribution volume of drugs and its dependence on binding to tissues and plasma
Proc. 2nd Europ. Congr. Biopharm. Pharmacokin., Clermont-Ferrand, Vol. 2, pp. 242 - 252 (1984)
- (67) Leo A., Hansch C., Elkins D.
Partition coefficients and their uses
Chem. Rev. 71: 525 - 616 (1971)
- (68) Kutter E.
Arzneimittelentwicklung
Thieme, Stuttgart (1978)
- (69) Scholtan W.
Die hydrophobe Bindung der Pharmaka an Humanalbumin und Ribonucleinsäure
Drug Res. 18: 505 - 517 (1968)

- (70) Fichtl B., Kurz H.
Tissue binding of drugs: interrelations between drug binding in different tissues and dependence on lipid solubility
Proc. 1st Europ. Congr. Biopharm. Pharmacokin., Clermont-Ferrand, Vol. 2, pp. 187 - 194 (1981)
- (71) Fichtl B.
Die Bindung von Pharmaka an menschliches Muskelgewebe
Dissertation, Universität München 1974
- (72) Kurz H.
Die Bedeutung der Lipidlöslichkeit in der Pharmakologie
Präp. Pharmazie 6: 1 - 12 (1970)
- (73) Raaflaub J.
Über die Beziehung zwischen Lipidlöslichkeit von Pharmaka und ihrem pharmakokinetischen Verhalten
Experientia 26: 457 - 576 (1970)
- (74) Desmond P.V., Roberts R.K., Wood A.J.J., Dunn G.D., Wilkinson G.R., Schenker S.
Effect of heparin administration on plasma binding of benzodiazepines
Br. J. clin. Pharmacol. 9: 171 - 175 (1980)
- (75) Pfeffer M.
COMPT, a time sharing program for nonlinear regression analysis of compartmental models of drug distribution
J. Pharmacokin. Biopharm. 1: 137 - 163 (1973)
- (76) Rowland M., Tozer T.N.
Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications
Philadelphia 1980
- (77) Kurz H., Trunk H., Weitz B.
Evaluation of methods to determine protein-binding of drugs
Drug Res. 27 (II): 1373 - 1380 (1977)

- (78) Hamilton S.F., Waller E.S., Yakatan G.J., Ludden T.M.
The production of free fatty acids in post-heparin plasma during equilibrium dialysis
Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology 35: 519 - 522 (1982)
- (79) Kristensen C.B., Gram L.F.
Equilibrium dialysis for determination of protein binding of imipramine - evaluation of a method
Acta pharmacol. et toxicol. 50: 130 - 136 (1982)
- (80) Baur G., Kurz H., Trunk H.
Alteration of protein-binding during storage of human plasma preparations
Anaesthesist 26: 148 - 150 (1977)
- (81) Blackman G.L., Jordan J.G.
Analysis of thiopentone in human plasma by high-performance liquid chromatography
J. Chromatography 145: 492 - 495 (1978)
- (82) Goldbaum L.R.
An ultraviolet spectrophotometric procedure for the determination of barbiturates
J. Pharmacol. Exp. Ther. 94: 68 - 75 (1948)
- (83) Weikel J.H., Wheeler A.G., Joiner P.D.
Toxicology, absorption, and physiological disposition of isoxsuprine (Vasodilan)
Toxicol. Appl. Pharmacol. 1: 579 - 589 (1959)
- (84) Brodie R.R., Chasseaud L.F., Taylor T.
High-performance liquid chromatography determination of benzodiazepines in human plasma
J. Chromatogr. 150: 361 - 366 (1978)

- (85) Johnson M., Chan C., Cheng S., Shimek J.L., Nygard G., Wahba Khalil S.K.
Isocratic high-performance liquid chromatographic method for the determination of tricyclic antidepressants and metabolites in plasma
J. Pharm. Sci. 71: 1027 - 1030 (1982)
- (86) Brodie B.B., Burns J.J., Mark L.C., Lief P.A., Bernstein E., Papper E.M.
The fate of pentobarbital in man and dog and a method for its estimation in biological material
J. Pharmacol. Exp. Ther. 109: 26 - 34 (1953)
- (87) Jähnchen E., Levy G.
Determination of phenylbutazone in plasma
Clin. Chem. 18: 984 - 986 (1972)
- (88) Shand D.G., Nuckolls E.M., Oates J.A.
Plasma propranolol levels in adults
Clin. Pharmacol. Ther. 11: 112 - 115 (1969)
- (89) Rowland M., Riegelman S.
Determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in plasma
J. Pharm. Sci. 56: 717 - 720 (1967)
- (90) Brodie B.B., Mark L.C., Papper E.M., Lief P.A., Bernstein E., Rovenstine E.A.
The fate of thiopental in man and a method for its estimation in biological material
J. Pharmacol. Exp. Ther. 98: 85 - 96 (1950)
- (91) Roos A., Boron W.F.
Intracellular pH
Physiol. Rev. 61: 296 - 434 (1981)
- (92) Halestrap A.P.
Transport of pyruvate and lactate into human erythrocytes
Biochem. J. 156: 193 - 207 (1976)

- (93) Arendt R.M., Greenblatt D.J., Divoll M., Abernethy D.R.,
Giles H.G., Sellers E.M.
Predicting in vivo benzodiazepine distribution based on
in vitro lipophilicity
Clin. Pharmacol. Ther. 31: 200 (1982)
- (94) Kiehs K., Hansch H., Moore L.
The role of hydrophobic bonding in the binding of organic
compounds by bovine hemoglobin
Biochem. 5: 2602 - 2605 (1966)
- (95) Hilzenbecher C.
Die Bindung von Pharmaka an Humanhämoglobin
Diss. Universität München, 1972
- (96) Gerlowski L.E., Jain R.K.
Physiologically based pharmacokinetic modeling:
principles and applications
J. Pharm. Sci. 72: 1103 - 1127 (1983)
- (97) Lin J.H., Sugiyama Y., Awazu S., Hanano M.
In vitro and in vivo evaluation of the tissue-to-blood
partition coefficient for physiological pharmacokinetic
models
J. Pharmacokin. Biopharm. 10: 637 - 647 (1982)
- (98) Wang P.H., Lien E.J.
Effects of different buffer species on partition coeffi-
cients of drugs used in quantitative structure-activity
relationships
J. Pharm. Sci. 6: 662 - 668 (1980)
- (99) Smith R.N., Hansch C., Ames C.C.
Selection of a reference partitioning system for drug
design work
J. Pharm. Sci. 64: 599 - 606 (1975)

- (100) Goldbaum L.R., Smith P.K.
The interaction of barbiturates with serum albumin and
its possible relation to their disposition and pharmaco-
logical actions
J. Pharmacol. Exp. Ther. 111: 197 - 209 (1973)
- (101) Hansch C., Leo A.
Substituent constants for correlation analysis in
chemistry and biology
J. Wiley, New York - Chichester - Brisbane - Toronto
(1979)
- (102) Seydel J.K., Schaper K.-J.
Quantitative structure-pharmacokinetic relationship in
drug design
Pharmac. Ther. 15: 131 - 182 (1982)
- (103) Rekker R.F.
Hydrophobic aspects of binding.
Il Farmaco, ed. sci. 34: 345 - 370 (1978)
- (104) v. Meyer L.
Die Bestimmung von Arzneistoffkonzentrationen in der Lun-
ge zur Beurteilung tödlicher Vergiftungen
Habilitationsschrift, Universität München 1983
- (105) Nagy A., Johansson R.
Plasma levels of imipramine and desipramine in man after
different routes of administration
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 290: 145 - 160 (1975)
- (106) Capomacchia A.C., Vallner J.J.
Human plasma levels of propranolol: fluorometric
measurement in a hydrosolvatic system
J. Pharm. Sci. 69: 1463 - 1465 (1980)

- (107) van der Kleijn E.
Protein-binding and lipophilic nature of ataractics of
the meprobamate- and diazepam-group
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 179: 225 - 250 (1969)
- (108) Seebald H., Forth W.
Absorption of ^{14}C -Bumadizone-Ca and ^{14}C -Phenylbutazone
in isolated intestinal segments in vitro and tied-off
gastrointestinal sections in vivo of rats and guinea
pigs
Drug Res. 27(1): 624 - 636 (1977)
- (109) van Peer A.P., Belpaire F.M., Rossel M.T., Bogaert M.G.
Distribution of antipyrine, phenylbutazone and pheny-
toin in experimental renal failure
Pharmacology 22: 139 - 145 (1981 a)
- (110) Forth W., Henschler D., Rummel W.
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
Mannheim, Wien, Zürich, 1983
- (111) Kurz H.
Einfluß der physikalisch-chemischen Eigenschaften von
Kurzzeitnarkotika auf den "hangover"
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmak. exp. Path. 255:
33 - 34 (1966)

Lebenslauf

Gabriele Schuhmann

geboren am 25. 5. 1957 in Würzburg, als Tochter von Bruno Schuhmann, Buchdrucker, und Gertrud Schuhmann, geb. Klietsch

Wohnort

München

Schulbildung

1963 - 1969 Hauptschule (Goetheschule) in Würzburg;
1969 - 1976 siebenjährige Kurzform des wirtschaftswissenschaftlichen Gymnasiums (Schönborngymnasium) in Würzburg;
25. 6. 1976 Reifeprüfung

Studium der Pharmazie

WS 1976 - SS 1978 Julius-Maximilians-Universität Würzburg;
WS 1978 - SS 1980 Ludwig-Maximilians-Universität München;
September 1980 - August 1981 Pharmaziepraktikum in der Rumford-Apotheke in München;
24. 9. 1981 Pharmazeutische Prüfung in München;
16. 10. 1981 Approbation als Apothekerin

Wissenschaftliche Tätigkeit

September 1981 - Dezember 1984 unter Anleitung von Prof. Dr. H. Kurz am Institut für Pharmakologie und Toxikologie und Prof. Dr. K. Thoma am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München

Berufliche Tätigkeit

April 1982 - Dezember 1984 als wissenschaftliche Hilfskraft (teilzeit beschäftigt), ab Februar 1985 als vollbeschäftigte wiss. Hilfskraft am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität München

